

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

VIRUS RABIQUE ET CELLULES NÉOPLASIQUES

par C. LEVADITI, M^{lle} R. SCHOEN et L. REINIÉ.

L'affinité de certains virus pour les cellules néoplasiques était à prévoir, dès l'instant où Levaditi et Nicolau (1) ont montré que le *neurovaccin* s'attaque, de préférence, aux éléments épithéliaux de la peau en voie de division mitotique. La caryocinèse fait point d'appel, d'où une analogie, encore insoupçonnée, entre le mode d'action des ultravirus, d'une part, des rayons X, ou des radiations du radium, d'autre part. En fait, soit avec Nicolau (2), soit avec Constantinesco (3) et Arager (4), Levaditi a montré que le *neurovaccin*, de même que le virus syphilitique, se développe au contact des cellules néoplasiques greffées à des animaux réceptifs (souris et rats). Ces cellules empruntent, d'ailleurs, à l'organisme-hôte, l'état réfractaire que celui-ci acquiert à un moment donné (5).

En est-il de même du virus rabique? Afin d'élucider ce problème, nous nous sommes adressés à la tumeur épithéliale

(1) Ces *Annales*, **37**, 1923, p. 1.

(2) *C. R. Acad. des Sciences*, **173**, 1921, p. 870 ; Ces *Annales*, **37**, 1923, p. 443.

(3) *C. R. Acad. des Sciences*, **194**, 1932, p. 662 et 1275 ; *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 286.

(4) *C. R. Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 770.

(5) Tout récemment encore, LEVADITI et HABER (*C. R. Acad. des Sciences*, 1936, **202**, p. 2018) ont révélé l'affinité du virus de la peste aviaire pour les tumeurs épithéliales de la souris.

dite de Pearce, et à un virus rabique des rues (souche Bucarest II), particulièrement apte à engendrer des corps de Negri dans les neurones et les cellules épithéliales de la cornée chez le lapin [Levaditi et Schoen (6)]. Nous avons pratiqué des greffes néoplasiques dans la chambre antérieure de l'œil et dans les testicules de lapins, auxquels nous conférons la rage par inoculation de virus dans le cerveau ou dans la cornée de l'œil opposé. Alors que l'animal contracte la rage et que le néoplasme se développe, on apprécie la virulence de la tumeur par inoculation à des animaux réceptifs (lapins et souris), et l'on s'en sert pour pratiquer une nouvelle greffe, soit dans l'œil, soit dans l'encéphale d'un lapin neuf. Or, quelles que soient les conditions expérimentales, on constate que le virus rabique cultive dans la greffe tumorale oculaire, et qu'il y persiste pendant plusieurs passages consécutifs, le néoplasme devenant ainsi apte à conférer la rage. En outre, et surtout à partir du premier passage, *des corps de Negri absolument typiques, et parfois volumineux, font leur apparition dans les cellules néoplasiques, même si celles-ci sont en voie de mitose*. La négrigenèse éclot, simultanément, dans les épithéliums cornéens des deux yeux.

La voie suivie par le virus rabique est la suivante : parti de la cornée inoculée de rage, il atteint l'encéphale, en cheminant le long des connexions nerveuses cornéennes (*neuroprobasie centripète*), s'y développe et atteint la cornée opposée par le même chemin, qu'il parcourt en sens inverse. Arrivé de la sorte au contact de la tumeur, il la contamine et y engendre, au cours des greffes successives, des corps de Negri. Au surplus, de tels corps peuvent être décelés dans les greffes néoplasiques intracérébrales.

Ces constatations préliminaires ont fait l'objet d'une note présentée à l'Académie des Sciences, le 24 février 1936, laquelle se terminait par les conclusions suivantes :

« Le virus rabique des rues offre une affinité élective pour les cellules néoplasiques du carcinome de Pearce. Il s'y développe et y engendre des corps de Negri. La négrigenèse n'est

(6) Ces *Annales*, Supplément (numéro commémoratif sur la Rage), 25 octobre 1935, p. 69.

donc pas l'apanage exclusif des neurones et des épithéliums cornéens. Des éléments néoformatifs partagent avec ceux-ci la faculté de permettre l'éclosion de la phase visible du cycle évolutif du virus rabique des rues. »

Nous avons continué ces recherches, non seulement avec le virus rabique des rues, mais encore avec deux souches de virus fixe. Les résultats enregistrés ont confirmé ceux exposés sommairement dans la note sus-mentionnée ; nous en donnons les détails dans le présent mémoire.

I. — NÉOPLASME GREFFÉ DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL.

Cinq séries d'expériences ont été effectuées ; nous ne relaterons ici que les résultats de la deuxième de ces séries, les autres étant plus ou moins calquées sur celle-ci :

SÉRIE II. — Le lapin 735 D est inoculé de rage (souche des rues, Bucarest II), dans la *cornée gauche* (scarification), et greffé, au même moment, dans la chambre antérieure de l'œil opposé, avec un fragment de la tumeur Pearce. Le néoplasme se développe progressivement, ce dont on peut s'assurer par l'examen journalier de la chambre antérieure droite. L'animal est sacrifié, rabique, le treizième jour. L'examen microscopique révèle des lésions de rage et des corps de Negri dans l'encéphale, et aussi des corpuscules oxyphiles dans les épithéliums des deux cornées. L'inoculation du cerveau et de la cornée de l'œil droit (celle qui est en contact avec la tumeur), effectuée à des souris, fournit des résultats nettement positifs. Présence de corps de Negri dans quelques cellules néoplasiques, s'étant développées dans le tissu cornéen ; absence de tels corps dans la tumeur éclosée dans la chambre antérieure.

1^o PASSAGE OCULAIRE. — La tumeur du lapin 735 D est inoculée dans la chambre antérieure des lapins 805 D, 806 D et 807 D. Tous font un néoplasme local et succombent de rage le onzième jour. Constatations identiques aux précédentes. La tumeur du lapin 807 D, ainsi que l'encéphale se révèlent virulentes pour la souris.

1^{er} passage cérébral. — L'épithélioma du lapin 735 D est inoculé, par voie intracérébrale, au lapin 803 D. Celui-ci succombe de rage le neuvième jour. Altérations rabiques du cerveau et développement d'une tumeur cérébrale située dans le ventricule latéral. Présence de corps de Negri dans les cellules néoplasiques et dans les neurones de la corne d'Ammon. Virulence de la tumeur oculaire pour la souris.

2^e passage. — Deux seconds passages sont effectués ; ils fournissent tous deux des résultats identiques. En voici un exemple : l'épithélioma oculaire du lapin 805 D (premier passage) est greffé dans la chambre antérieure droite du lapin 801 D. Celui-ci est sacrifié, rabique, le onzième jour. Constatations identiques aux précédentes.

Des passages semblables sont successivement réalisés sur les lapins 946 D, 127 E, 169 E, 218 E, 287 E, 454 E et 487 E. Ces animaux sont morts de rage, ou ont été sacrifiés rabiques, respectivement les douzième, neuvième, douzième, treizième, douzième, treizième et onzième jours.

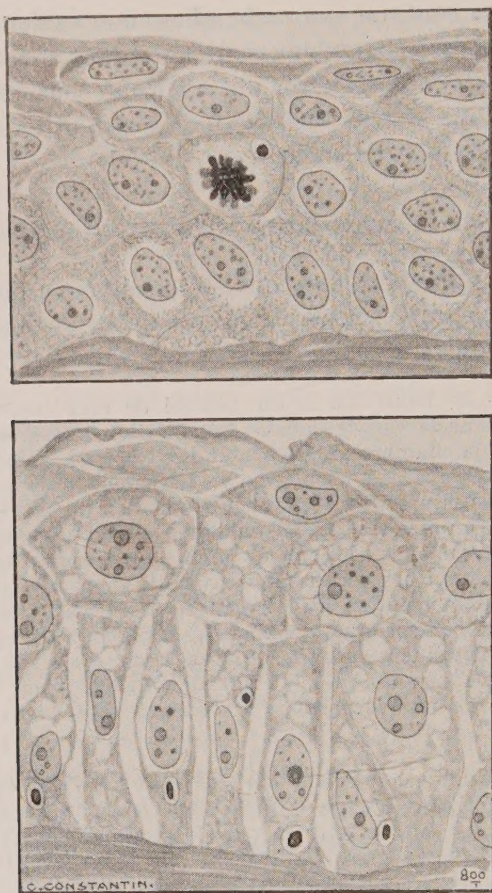


FIG. 1. — Présence de corps de Negri dans les épithéliums cornéens. [Une cellule en voie de mitose contient un corps de Negri (lapin 757 E et 949 D). Mann. Gross. : 800/1.

Chez tous, excepté chez le dernier, la tumeur oculaire montrait des corps de Negri dans les cellules épithéliomateuses ; chez tous, également, le cerveau était le siège d'altérations rabiques typiques et contenait, dans les neurones de la corne d'Ammon, des corpuscules oxyphiles typiques, plus ou moins développés.

Ainsi, la rage a pu être conférée neuf fois successivement, par simple greffe de tumeur de Pearce dans la chambre antérieure de l'œil. Ces transmissions ont été interrompues volontairement.

EXAMEN HISTOLOGIQUE DE L'ŒIL. — La cornée est épaissie et, parfois, perforée par la tumeur, alors que celle-ci a pris un développement par trop exagéré. Cet épaississement est dû



FIG. 2. — *Lapin 806 D.* Vue d'ensemble du développement de la tumeur dans la chambre antérieure de l'œil. Mann. Gross. : 5/4.

à un œdème du tissu cornéen ; ce tissu est, souvent, infiltré par des polynucléaires, surtout au niveau du limbe. Dans certains cas, le néoplasme apparaît sous forme de petits foyers intra-cornéens, emprisonnés entre les lames de la cornée elle-même. Les épithéliums cornéens n'offrent pas d'altérations bien manifestes, excepté, çà et là, une hypertrophie cytoplasmique et un état vacuolaire des noyaux (fig. 4).

LA TUMEUR. — Celle-ci s'appuie, d'une part, sur l'iris et le processus ciliaire, et, d'autre part, sur la membrane de Desce-

met (fig. 2). Elle entre ainsi en contact intime avec la face postérieure de la cornée. Fréquemment, une exsudation séro-fibrineuse et hémorragique s'infiltre dans l'espace libre qui, en certains endroits, sépare le néoplasme de la membrane de Descemet ; cette exsudation peut d'ailleurs contenir des éléments tumoraux isolés. *Ce qui est impressionnant, par dessus tout, c'est la présence de corps de Negri typiques dans les épithéliums néoplasiques.* Ces corps, de volume variable, pouvant atteindre 7 à 8 μ , sont situés dans le cytoplasme, plus ou

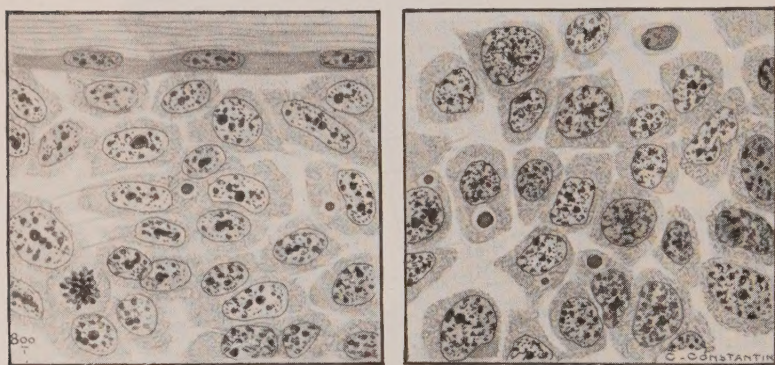


FIG. 3. — *Lapin 807 D.* Tumeur oculaire rabique (chambre antérieure œil). Premier passage. Corps de Negri dans les cellules néoplasiques. Mann. Gross. : 800/1.

moins près du noyau et se colorent en rouge vif, ou en violet plus pâle, par la méthode Mann (fig. 3, 4 et 5). *Ils sont d'autant plus abondants que l'on se rapproche de la cornée.* Généralement, on ne les découvre guère dans les cellules tumorales qui se sont développées au contact même de l'iris, ou du processus ciliaire, fait important du point de vue du mécanisme qui préside à leur genèse. Chez certains d'entre eux, notamment les plus volumineux, la méthode de Giemsa prolongée permet de déceler une structure interne (granulations oxyphiles incluses dans une masse homogène encapsulée); souvent, ils sont entourés d'un halo clair. A remarquer, également, que les cellules néoplasiques sont disposées radiairement autour de vaisseaux qui assurent la nutrition de la

tumeur, et que les épithéliums les plus riches en corps de Negri sont, précisément, ceux qui se rattachent le plus intimement à la paroi de ces vaisseaux (fig. 6).

Enfin, ainsi que nous l'avons dit précédemment, la *multi-*

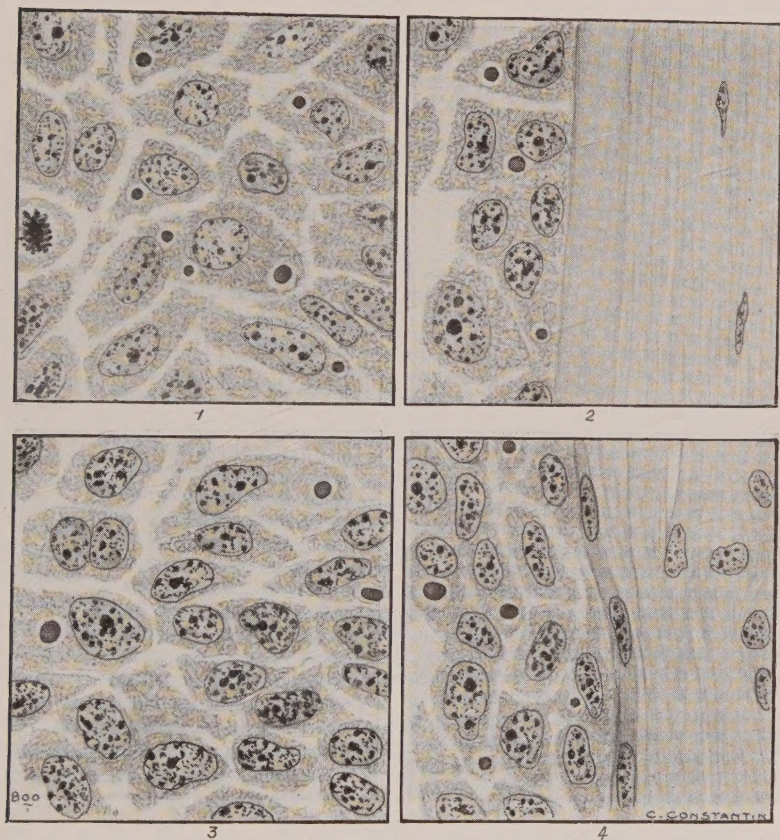


FIG. 4. — 1, *lapin 735 D*. Métastase cornéenne. Primo-inoculation. Corps de Negri dans les cellules néoplasiques; 2, 3 et 4, négri-genèse dans les tumeurs oculaires de différents passages. Mann. Gross. : 800/1.

plication caryocinétique des éléments néoplasiques n'est pas incompatible avec le développement des corps de Negri dans le cytoplasma cellulaire. Ils nous a été donné, en effet, de déceler fréquemment des corps oxyphiles, absolument typi-

ques, dans de telles cellules en voie de mitose, sans que celles-ci paraissent en souffrir manifestement (fig. 6).

EXAMEN HISTOLOGIQUE DU CERVEAU. — Nous avons constaté, soit chez le lapin, soit, exceptionnellement, chez la souris, le

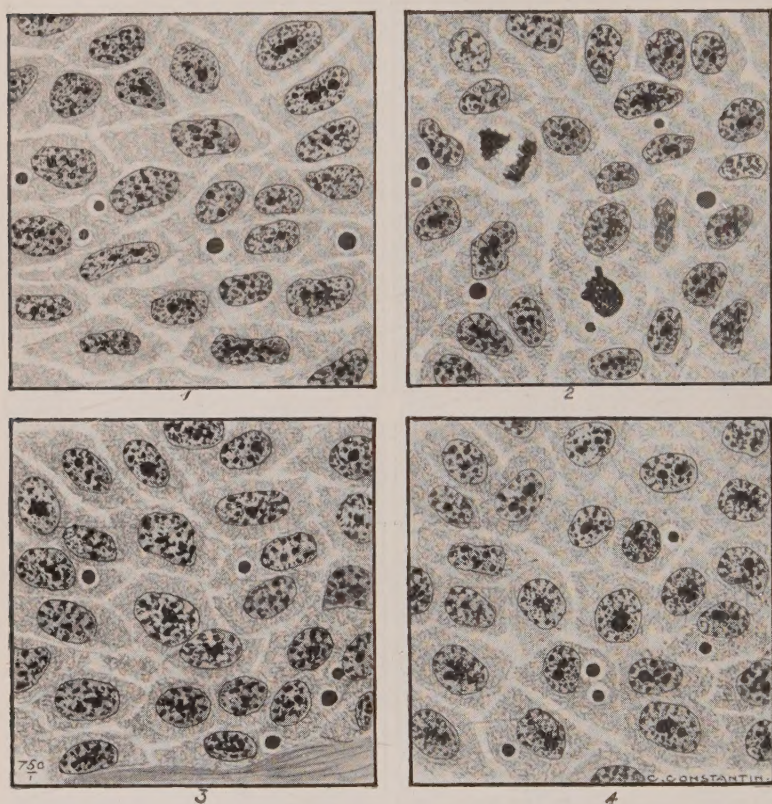


FIG. 5. — 1, lapin 881 D. Tumeur oculaire rabique du deuxième passage. Corps de Negri dans les cellules néoplasiques; 2, lapin 882 D. Idem; 3, lapin 946 D. Tumeur oculaire rabique du troisième passage. Corps de Negri dans les cellules néoplasiques; 4, lapin 127 E. Tumeur oculaire rabique du quatrième passage. Mann. Gross. : 750/1.

développement de greffons néoplasiques dans l'encéphale, après inoculation transcrânienne de tumeurs rabigènes. La greffe se situe, généralement, dans les ventricules latéraux, ou encore dans le quatrième ventricule, tout contre la paroi,

en contact intime avec les cellules épendymaires. Elle exerce une compression nette sur les tissus environnants et n'atteint jamais le volume de la greffe similaire oculaire. Or, ici également, il est très facile de constater l'éclosion de corps de Negri dans les cellules tumorales chez le lapin (fig. 7).

Les autres séries de passages ont fourni des résultats semblables, en tous points, aux précédents, sauf que le nombre des transmissions en série a été manifestement plus réduit

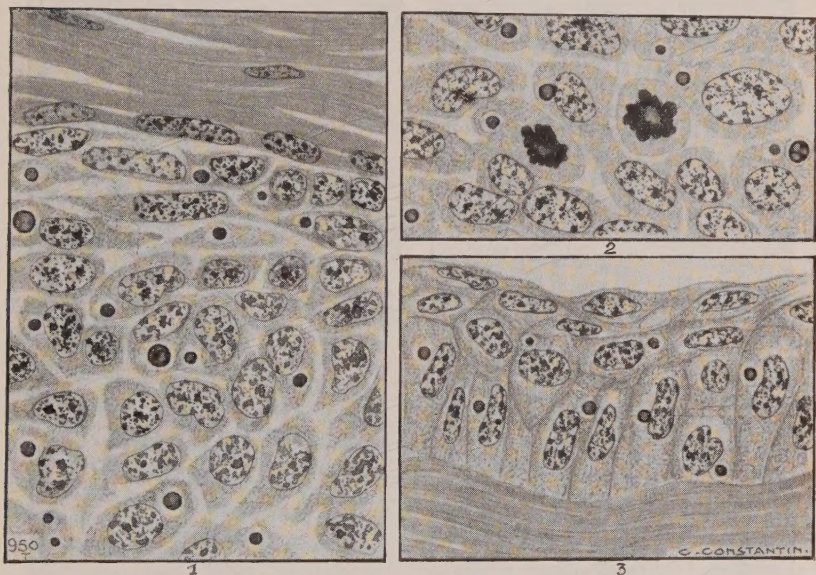


FIG. 6. — *Lapin 660 D.* 1, néoplasme oculaire. Métastase cornéenne. Corps de Negri; 2, *Idem.* Corps de Negri dans une cellule néoplasique en voie de mitose, 3, Corps de Negri dans l'épithélium cornéen. Mann. Gross. : 950/1.

(2, 4 et 7). Nous avons eu l'impression qu'au fur et à mesure de ces passages successifs, le potentiel prolifératif de la tumeur rabique oculaire allait en décroissant, ce qui provoquait un arrêt des inoculations en série. Ceci peut être attribué à deux facteurs : ou bien à l'obligation où l'on se trouve d'effectuer ces inoculations d'une manière par trop rapprochée, en raison même de la mort précoce de l'animal rabique, ce qui n'est pas sans diminuer progressivement le volume du greffon utilisable ; ou bien cet épuisement est dû à la conta-

mination rabique des éléments néoplasiques. Les faits observés par Levaditi et Nicolau (*loc. cit.*), concernant la vaccine, dans ses rapports avec les néoplasmes, nous incitent à incliner vers cette seconde hypothèse. Et cela d'autant plus que, lors

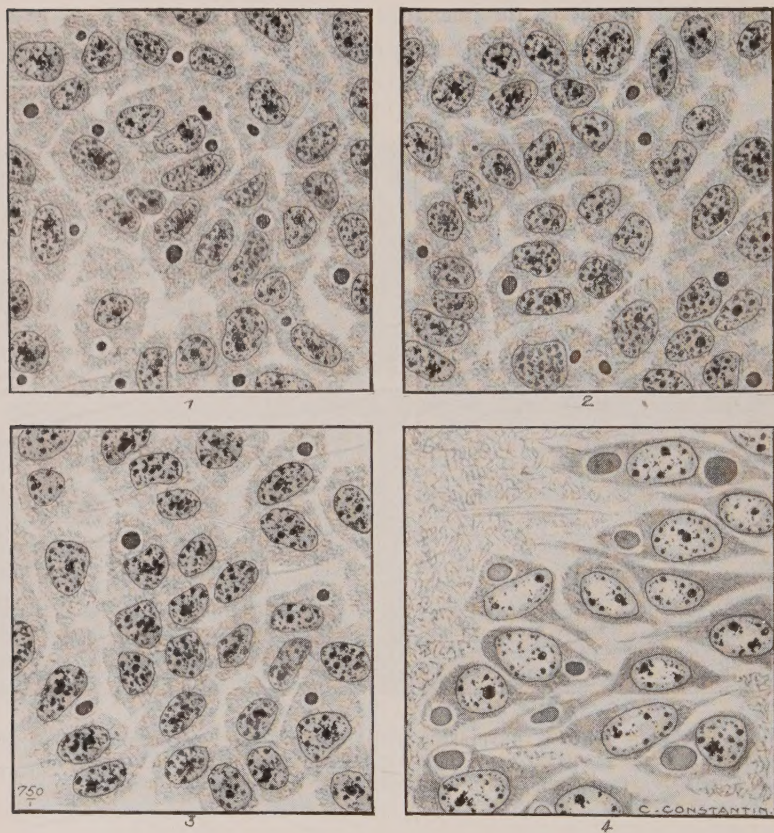


FIG. 7. — 1, *Lapin 805 D.* Greffe intracérébrale de tumeur oculaire rabique. Corps de Negri dans les cellules néoplasiques du greffon neuraxique; 2, *Lapin 886 D.* Tumeur oculaire du deuxième passage greffée dans le cerveau. Corps de Negri dans les cellules néoplasiques; 3, *lapin 887 D* Idem; 4, *Souris 996.* Inoculée avec une tumeur rabique de deuxième passage. Corps de Negri dans les neurones de la corne d'Ammon. Mann et méthode de P. Lépine. Gross. : 750/1.

de nos essais de transmission, par voie oculaire, de la tumeur de Pearce non rabique, un tel arrêt spontané n'a pas été observé. En voici un exemple :

EXPÉRIENCE. — 17 passages ont été effectués d'œil à œil (chambre antérieure), les prélèvements ayant été opérés au rythme suivant :

Direct : quatorze, quatorze, treize, neuf, dix, huit, douze, neuf, douze, douze, onze, dix, quinze, dix, onze, dix et vingt jours.

Or, à la suite de chaque nouvelle inoculation, l'épithélioma s'est développé comme d'habitude, envahissant toute la chambre antérieure et empiétant, parfois, sur la membrane cornéenne. Aucun épuisement du potentiel prolifératif du carcinome n'a été relevé.

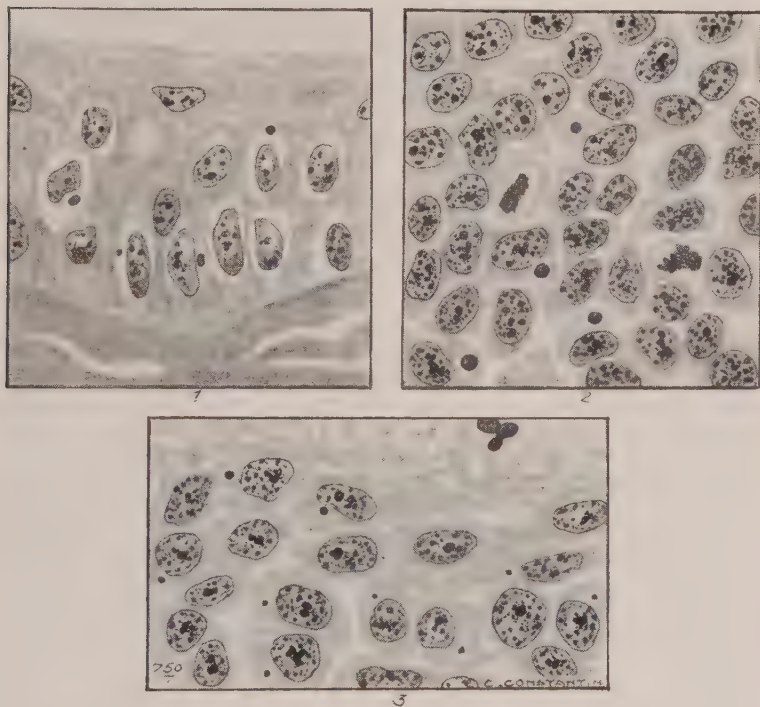


FIG. 8. — 1, *Lapin 861 D*. Corps de Negri dans les cellules épithéliales de la cornée; 2 et 3, infection de la tumeur, par mélange *in vitro*. Métastases cornéennes. Présence de corps de Negri. Mann. Gross. : 750/1.

Il est intéressant de constater, par ailleurs, que l'humeur aqueuse où baigne la tumeur oculaire, peut contenir le virus rabique. L'expérience que voici le prouve amplement :

EXPÉRIENCE. — *Lapin 476 D*, inoculé par voie cérébrale, rabique le douzième jour. L'humeur aqueuse est injectée, par voie transcrânienne, aux souris 904 et 905. La première de ces souris succombe de rage, contrôlée histologiquement, le seizième jour.

Lapin 846 D, inoculé par voie transcranienne, rabique le dixième jour. L'humeur aqueuse est inoculée aux souris 953, 954 et 955 ; la première de ces souris meurt de rage le septième jour [contrôle histologique positif] (7).

II. — GREFFE OCULAIRE DE NÉOPLASMES PRÉALABLEMENT IMPRÉGNÉS DE VIRUS RABIQUE *in vitro*.

Ce qui précède nous a montré que l'épithélioma de Pearce se contamine de rage et élabore des corps de Negri, lorsqu'il se développe dans la chambre antérieure de lapins, rendus rabiques par inoculation de virus dans le cerveau, ou dans la cornée, et, qu'à partir de là, il devient apte à conférer la rage, chaque fois qu'on le transfère dans la même chambre antérieure d'un animal neuf. La contamination s'effectue ici *in vivo*. Obtient-on des résultats analogues si l'on a soin d'imprégner, au préalable, la tumeur de virus rabique *in vitro* ?

EXPÉRIENCE. — Des fragments de néoplasme s'étant développé dans le parenchyme testiculaire, sont plongés dans une émulsion clarifiée de virus rabique, souche Bucarest II. Greffe immédiate dans la chambre antérieure des lapins 919 D et 920 D. Le premier meurt de rage le quinzième jour et présente un volumineux néoplasme oculaire, dépourvu de corps de Negri, lesquels sont, toutefois, présents dans les épithéliums des deux cornées. La tumeur se révèle rabique pour la souris. Le second (920 D) se comporte comme le premier. Il est sacrifié rabique le dixième jour ; négrigénèse dans une métastase cornéenne et virulence tumorale ; deux passages oculaires consécutifs, positifs à tous points de vue.

Ainsi, cette expérience montre que la contamination rabique de l'épithélioma de Pearce peut s'effectuer *in vivo*, aussi bien qu'*in vitro*, la pullulation du virus dans le néoplasme et la négrigénèse intra-tumorale se faisant d'une manière absolument identique, dans un cas comme dans l'autre.

Or, le résultat est le même si, après contact avec le virus rabique des rues *in vitro*, on a soin de laver les fragments néoplasiques, avant de les greffer dans la chambre antérieure

EXPÉRIENCE. — Epithélioma de Pearce cultivé dans la chambre antérieure du lapin 264 E. Des fragments sont immergés dans une

(7) Il en est de même de la virulence de l'iris.

émulsion névrauxique virulente (Buc. II), et laissés en contact avec le virus pendant deux heures à la température du laboratoire. Centrifugation à 3.000 t. m. et double lavage à l'eau salée isotonique. Le lapin 421 E est greffé, dans la chambre antérieure, avec des particules de néoplasme simplement centrifugé ; le lapin 422 E reçoit le greffon après centrifugation et lavage : ils deviennent tous deux rabiques le seizième jour (confirmation histologique et virulence du cerveau), et sont porteurs de tumeurs oculaires hautement rabigènes pour la souris, quoique dépourvues de corps de Negri (8).

D'ailleurs, *un néoplasme déjà contaminé de rage in vivo, par suite de son développement dans la chambre antérieure d'un lapin rabique lui-même, continue à l'être, après lavage préalable et centrifugations répétées, témoin l'expérience que voici :*

EXPÉRIENCES. — Tumeur oculaire rabique et négrigène provenant du lapin 622 E. Des fragments sont immergés dans 6 cent. cubes d'eau salée isotonique, puis centrifugés. Deuxième lavage identique au précédent. Résultat : les liquides de lavage sont virulents pour la souris, et la tumeur lavée, puis greffée dans la chambre antérieure du lapin 694 E, lui confère la rage le quatorzième jour et se développe dans cette chambre, où elle apparaît assez fortement négrigène. Corps de Negri dans les épithéliums des deux cornées.

Ainsi, *quelles que soient les conditions où l'on se place, le virus rabique des rues révèle constamment une affinité élective pour les éléments néoplasiques de la tumeur de Pearce. Une fois fixé, soit in vitro, soit dans l'organisme vivant, sur ces éléments, il ne les quitte plus et y pullule, non sans engendrer des corps de Negri intra-cytoplasmiques absolument typiques.*

III. — GREFFES DE NÉOPLASMES RABIQUES EFFECTUÉES AILLEURS QUE DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL.

S'il est exact qu'une tumeur contaminée de rage continue à être virulente et négrigène, lors de son implantation dans la chambre antérieure de l'œil, en est-il de même si une telle tumeur est greffée ailleurs, par exemple dans le *testicule*, la *peau*, ou le *nerf sciatique* ? Examinons ce problème.

(8) Nous verrons, par la suite, que la primo-inoculation de la tumeur ne s'accompagne pas de négrigénèse néoplasique.

a) TESTICULE. — Nous avons, à plusieurs reprises, inoculé dans le testicule de lapins neufs, des greffons de tumeur Pearce de provenance oculaire et contaminés de rage. Cette inoculation a parfois (Lap. 413 E et 415 E) conféré la rage à l'animal greffé, peu importe si le néoplasme s'est développé ou non dans le parenchyme testiculaire (9). Or, dans les rares cas où le néoplasme a réussi à pulluler dans ce parenchyme, il s'est révélé *avirulent et dépourvu de corps de Negri*. Le même néoplasme, greffé dans la chambre antérieure, a évolué comme d'habitude (v. précédemment).

b) PEAU. — Des carcinomes rabiques et négriqènes, d'origine oculaire, ont été greffés, par voie intra-cutanée, aux lapins 286 E, 449 E et 736. Le développement local du greffon n'est devenu manifeste que chez le dernier de ces animaux. Or, constamment, la greffe a conféré la rage (incubation de dix à onze jours) ce qui était à prévoir, mais la tumeur intradermique s'est révélée ingreffable sous la peau, greffable dans la chambre antérieure, non virulente et totalement anégrigène. Même résultat lorsque l'inoculation intra-cutanée était effectuée avec des fragments néoplasiques imbibés *in vitro* de virus rabique.

c) NERF SCIATIQUE. — L'inoculation d'un carcinome de Pearce, rabique et riche en corps de Negri, dans le nerf sciatique des lapins 433 E et 467 E, leur a conféré la rage (incubation de dix et douze jours), mais il n'y eut aucune poussée tumorale locale.

CONCLUSIONS. — Il résulte de l'ensemble de ces constatations que *pour qu'il y ait contamination rabique de la tumeur de Pearce et négriqénese néoplasique consécutive, il semble indispensable que le néoplasme se développe dans le cerveau, ou dans la chambre antérieure de l'œil* (10). C'est là, et, là seu-

(9) On sait que la greffe intra-testiculaire de la tumeur de Pearce ne fournit pas toujours des résultats positifs.

(10) Le résultat est également négatif, si la greffe tumorale est pratiquée dans la chambre postérieure de l'œil du lapin.

lement, que le milieu réalise les conditions optima exigées par cette contamination, et par la genèse de la phase visible du cycle évolutif du germe. Nous en exposerons les raisons ultérieurement.

IV. — LE VIRUS RABIQUE, INOCULÉ DANS LE CERVEAU,
SE LOCALISE-T-IL DANS DES CARCINOMES DE PEARCE S'ÉTANT
DÉVELOPPÉS AILLEURS QUE DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL ?
Y A-T-IL DISPERSION DE CE VIRUS DANS LES MÉTASTASES
TUMORALES ?

Nous avons vu, dans ce qui précède, que la contamination rabique de la tumeur de Pearce et la négrigénèse intra-tumorale consécutive, s'obtiennent lorsqu'on inocule le virus de la rage des rues dans la cornée, ou dans le cerveau. Le même phénomène apparaît-il lorsque le néoplasme est localisé ailleurs que dans l'œil, la rage étant provoquée par inoculation transcranienne ? Nous nous sommes adressé, pour cela à des lapins porteurs de carcinomes cutanés, testiculaires, rénaux, hépatiques ou conjonctivaux.

a) *Néoplasme cutané.* — Le lapin 498 E, porteur d'une tumeur de la peau obtenue par greffe, est inoculé de rage par voie intra-cérébrale. Il est sacrifié rabique, le neuvième jour. Sa tumeur est inoculée dans le cerveau de la souris 355, qui meurt de rage le huitième jour ; dans la chambre antérieure de l'œil du lapin 722 E, où elle se développe, en conférant la rage à ce lapin ; enfin, dans la peau du lapin 723 E. Chez ce dernier, un carcinome typique apparaît au point d'insertion, mais ni la tumeur, ni l'animal ne deviennent rabigènes, ou rabiques. Ajoutons que l'épithélioma cutané du premier lapin 498 E était dépourvu de corps de Negri.

Une seconde expérience ayant fourni un résultat identique au précédent (lapin 633 E), il y a lieu de conclure que le virus rabique des rues, inoculé, par voie intracérébrale, à des lapins porteurs de tumeurs de Pearce à siège cutané, contamine ces tumeurs, mais ne déclenche pas l'éclosion de corps de Negri dans les épithéliums néoplasiques.

b) *Métastases testiculaires, pulmonaires, rénales, hépatiques, conjonctivales.*

TUMEUR TESTICULAIRE. — *Inoculation de rage dans le cerveau.*

Expérience I. — Lapin 265 D. Absence de virus et de corps de Negri dans le cancer du parenchyme testiculaire.

Expérience II. — Lapin 266 D. Même résultat.

Expérience III. — Lapin 597 D. La tumeur testiculaire est inoculée aux souris 808 et 809. La première contracte la rage le dixième jour.

Expérience IV. — Lapin 721 D, résultat totalement négatif.

Il en résulte qu'une seule fois sur quatre essais, le virus rabique, inoculé directement dans le cerveau, est venu se localiser dans le néoplasme testiculaire, sans y engendrer, d'ailleurs, des corps de Negri.

c) Parmi les autres métastases examinées de ce point de vue, seule une tumeur pulmonaire s'est révélée virulente, quoique non négrigène.

Nous en concluons qu'une différence nette apparaît, si l'on compare le carcinome de Pearce à siège oculaire, au même carcinome localisé ailleurs, soit parce que inoculé dans d'autres tissus (testicule, peau), soit éclos spontanément par voie métastatique. Alors que dans le premier cas, l'épithélioma devient constamment virulent et négrigène, dans le second, sa virulence est exceptionnelle et sa négrigénèse nulle. Seule la peau semble se rapprocher plus du milieu oculaire, lequel apparaît ainsi comme seul capable de satisfaire, dans des conditions optima, les affinités néoplasiques du virus rabique.

V. — VIRUS FIXE ET NÉOPLASMES.

Il nous a semblé particulièrement intéressant de reproduire les expériences précédentes, en nous adressant au virus fixe. Pouvait-on, de la sorte, révéler quelques différences dans le comportement des cellules néoplasiques à l'égard des deux variétés de germes rabigènes? Nous avons utilisé deux souches de virus fixe : la souche Pasteur et la souche Tunis. Voici les résultats enregistrés :

a) *Virus fixe Pasteur.* — Les deux premiers essais ont montré que l'épithélioma, greffé dans la chambre antérieure de l'œil de lapins (S90 D et 165 E) inoculés de rage par voie intra-cérébrale, s'est bien développée, mais sans devenir rabigène, ni contenir des corps de Negri, même après greffe trans-duremérienne ultérieure. Les résultats ont été meilleurs dans le troisième essai, dont voici les détails :

EXPÉRIENCE. — Dès fragments de carcinome Pearce sont imprégnés de virus rabique fixe, par contact *in vitro* pendant une heure. Ils sont greffés dans la chambre antérieure de l'œil des lapins 750 E et 751 E. Ceux-ci contractent la rage (contrôle histologique et expérimental, inoculation du névraxe à la souris), et la tumeur se développe, chez eux, normalement. Cette tumeur, inoculée, à son tour, dans la chambre antérieure de l'œil (lapins 939 E, 942 E et 943 E), confère la rage (incubation de douze, douze et dix-sept jours) et augmente de volume. Greffée, par la même voie, aux lapins 972 E, elle se comporte exactement de la même manière, *mais tout s'arrête là. Il nous a été impossible de réaliser des passages réguliers, contrairement à ce qui a lieu lorsqu'on se sert du virus rabique des rues, souche Bucarest.*

b) *Virus fixe Tunis.* — On sait que cette souche de virus se révèle particulièrement négrigène chez le lapin, et surtout chez la souris (11). Les résultats ont été moins satisfaisants que dans le troisième essai de l'expérience précédente. Le néoplasme, imprégné de virus et greffé dans la chambre antérieure de l'œil du lapin 655 E, lui confère la rage (incubation de neuf jours), se développe à souhait et se révèle, de son côté, virulent pour les lapins 714 E (inoculation transcrânienne, greffe positive) et 716 E (inoculation oculaire). Toutefois, la transmission en série s'arrête ici. Au surplus, en aucun cas il ne nous a été donné de déceler des corps de Negri dans les cellules néoplasiques.

Aucun doute possible : *les souches rabiques fixes se comportent différemment des souches rabiques de rues, en ce sens que le potentiel rabigène des tumeurs s'éteint rapidement, à l'encontre de ce qui a lieu lorsqu'on se sert de ce virus rabique des rues.*

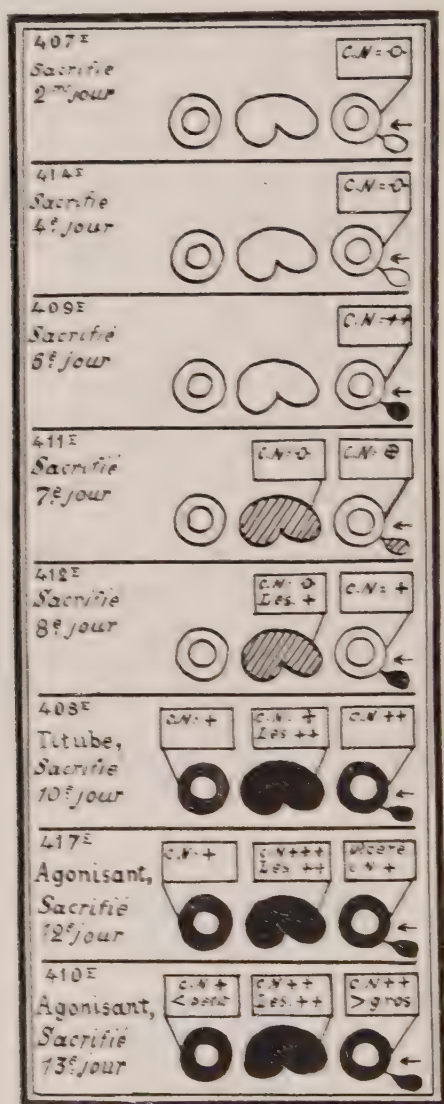
VI. — MÉCANISME PRÉSIDANT A L'AFFINITÉ DU VIRUS RABIQUE POUR LES CELLULES NÉOPLASIQUES.

Afin de préciser, autant qu'il nous sera possible, ce mécanisme, nous considérerons les deux phases du processus : *la phase initiale de la primo-inoculation, et la phase seconde des passages successifs.*

1° *Phase initiale de la primo-inoculation* (première greffe de tumeur « normale »). Lorsque nous greffons la tumeur de

(11) LEVADITI et SCHOEN : *C. R. de la Soc. de biol.*, **119**, 1935, p. 811.

Pearce dans la chambre antérieure de l'œil d'un lapin, auquel



*totale*ment neutre, du point de vue rabique. Mais, au fur et à mesure qu'elles se multiplient (et nous verrons ci-après de quelle manière cette multiplication s'opère), la dispersion du virus de la rage suit son chemin habituel, chemin précisé par de nombreuses expériences concernant la *neuroprobaspie* de ce virus. L'ultragerme poursuit sa *marc*he centripète vers les centres nerveux, le long des connexions neurotiques, atteint le cerveau et le bulbe, y pullule, crée des altérations typiques et des corps de Negri dans les neurones électifs, en même temps qu'en vertu de la *neuroprobaspie centrifuge*, il se répand dans

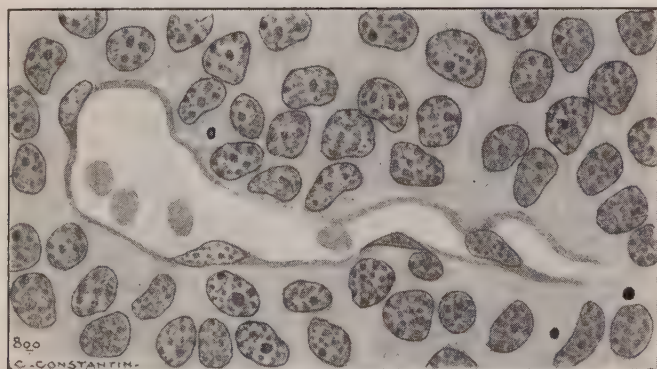


FIG. 9. — *Evolution. Lapin 409 E. Sixième jour.*

Corps de Negri dans deux cellules néoplasiques. Mann. Gross. : 800/1.

l'ensemble du système nerveux, y compris celui de l'œil. Tout ceci a lieu lorsque l'infection rabique a, comme porte d'entrée, la *cornée*. Si, au contraire, cette infection est réalisée par inoculation dans le *cerveau*, c'est la *neuroprobaspie centrifuge* seule qui entre en ligne. Quoi qu'il en soit, le virus rabique réussit à pénétrer dans le pôle antérieur de l'œil, et, se localisant dans les terminaisons nerveuses et dans l'épithélium cornéen (la présence de corps de Negri dans cet épithélium, ainsi que son potentiel rabigène le prouvent amplement), pénétrant, d'autre part, dans l'humeur aqueuse (dont nous avons montré ci-dessus la virulence), il crée, de la sorte, dans la chambre antérieure, un milieu hautement rabigène, là, précisément, où la tumeur est en voie de multiplication

caryocinétique. Les éléments néoplasiques pullulent donc dans une ambiance éminemment riche en ultravirus, et ne sauraient, par conséquent, se soustraire à la contamination qui les menace à chaque instant. Or, une telle imprégnation

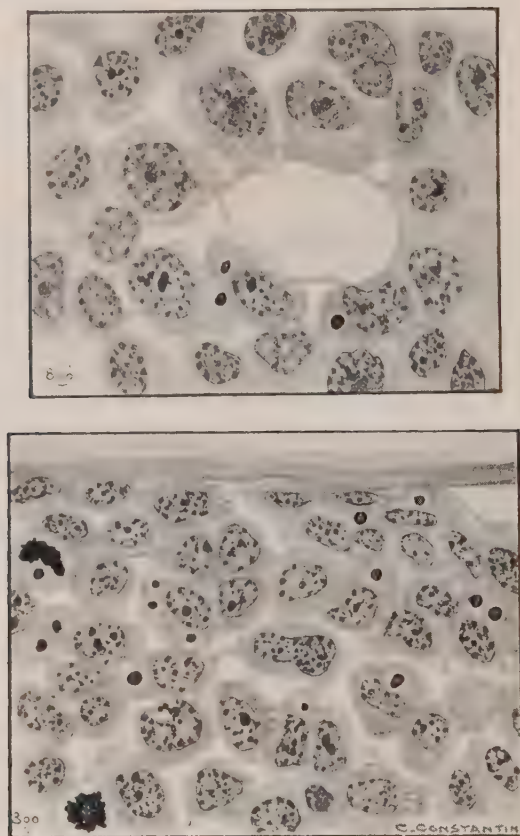


FIG. 10. — *Evolution. En haut : lapin 408 E. Dixième jour. En bas : lapin 440 E. Treizième jour. Mann. Gross. : 800/1.*

ne gêne nullement, au début, leurs facultés prolifératives, au contraire. Le germe trouve dans la cellule néoplasique un milieu éminemment propice à son développement, même si cette cellule est en voie de mitose.

Il se crée, de la sorte, un véritable symbiose entre le virus

rabique des rues et les épithéliums tumoraux, symbiose en tous points semblable à celle que Levaditi et Schoen (*loc. cit.*) ont révélée entre le même virus et les cellules épithéliales de la cornée.

Or, fait frappant : dans la grande majorité des cas, lors de cette première greffe, le néoplasme oculaire ne montre pas de corps de Negri. Quelles peuvent être les raisons de ce phénomène, en apparence paradoxal ? Les voici : les corps de Negri représentent, dans notre esprit, une phase visible intracellu-



FIG. 41. — *Evolution du néoplasme. Lapin 414E. Quatrième jour.*
Mann. Gross. : 60/1.

laire du cycle évolutif du virus de la rage des rues, *phase nettement tardive*, et qui nécessite un certain temps pour se développer et devenir accessible à nos moyens d'investigation. Il en résulte que l'envahissement de la tumeur par le germe rabique, à la suite de l'inoculation de ce germe dans le cerveau, ou dans la cornée opposée, s'effectuant tardivement et lentement, le virus n'a pas le temps matériel d'accomplir son cycle évolutif complet, l'animal succombant de rage avant l'apparition de corps de Negri dans les épithéliums néoplasiques. De là l'absence de tels corps, signalée ci-dessus.

2° *Phase seconde des passages ultérieurs.* — Il n'en est pas de

même lors des passages ultérieurs de la tumeur devenue rabique. Les épithéliums néoplasiques greffés sont déjà contaminés par le virus. Leur pullulation, lente au début, permet à l'ultra-germe rabique d'accomplir en entier son cycle évolutif, avant la mort de l'animal. En fait, dès le sixième jour, donc 3 à 6 fois vingt-quatre heures avant que le lapin succombe de rage, les corps de Negri deviennent visibles dans certains éléments tumoraux, et leur nombre augmente progressivement par la suite (schéma I, fig. 9 et 10). C'est ce qui résulte de l'expérience que voici :

EXPÉRIENCE (v. schéma I). — Un néoplasme oculaire rabigène et dépourvu de corps de Negri (primo-inoculation), est greffé dans la chambre antérieure de l'œil des lapins 407 E, 414 E, 409 E, 411 E, 412 E, 408 E, 417 E et 410 E. Ces animaux sont sacrifiés les deuxième, quatrième, sixième, septième, huitième, dixième (rage), douzième (rage) et treizième jours (rage). L'examen histologique des tumeurs oculaires montrent que les corps de Negri apparaissent dès le sixième jour dans les cellules néoplasiques, donc avant l'apparition des phénomènes rabiques, pour augmenter en nombre et en volume par la suite. Les passages oculaires, effectués avec la tumeur du lapin 410 E, ont fourni des résultats comparables à ceux exposés dans les protocoles expérimentaux précédents.

Nous avons vu que *le nombre des cellules néoplasiques contenant des corps de Negri est d'autant plus considérable que l'on se rapproche de la cornée*, et qu'il en est de même du volume des formations oxyphiles intra-cytoplasmiques. Le phénomène s'explique, si l'on tient compte du mode de développement de l'épithélioma greffé dans la chambre antérieure. En effet, les premières cellules tumorales inoculées s'appliquent sur l'iris et les procès ciliaires, où elles trouvent, du fait même de la richesse vasculaire, d'excellentes conditions pour pulluler (fig. 11). Or, au fur et à mesure de cette pullulation tumorale, les premières cellules, *les plus âgées*, sont repoussées vers la cornée par les générations ultérieures des *cellules filles, petites-filles, arrière-petites-filles*, etc... Il en résulte que, considéré dans son ensemble, le néoplasme est constitué par d'innombrables couches d'épithéliums d'âge différent, *les plus près de l'iris et des processus ciliaires étant les plus jeunes, celles au contact immédiat de la membrane de Descemet, les plus âgées*. S'il en est ainsi, on

conçoit que ces cellules étant, dans leur ensemble, contaminées par le virus rabique (que le milieu contient en abondance), l'ultragerme aura eu plus de temps pour accomplir son cycle évolutif dans les éléments cancéreux situés près de la cornée (*les plus âgés*), que dans ceux qui touchent à l'iris et au processus ciliaire (*plus jeunes qu'eux*), venant à peine d'éclore

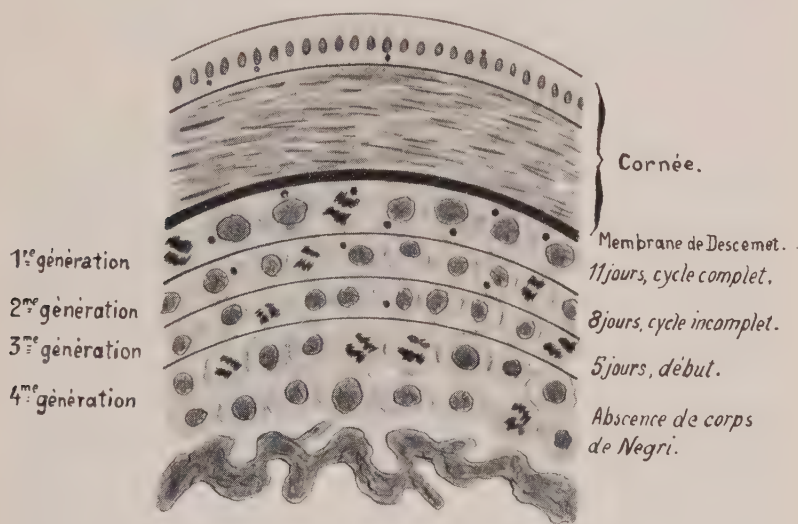


SCHÉMA II. — Evolution schématique du néoplasme, en rapport avec la negrigenèse.

(schéma II). Or, l'observation microscopique confirme pleinement cette hypothèse. Nous en concluons :

1° Que l'éclosion des corps de Negri, phase visible du cycle évolutif du virus rabique, est en fonction de l'âge des cellules néoplasiques, par conséquent du temps écoulé entre le moment où la contamination cellulaire s'effectue, et le moment où cette phase négri-gène doit s'accomplir ;

2° Qu'effectivement, les corps oxyphiles représentent une telle phase évolutive du virus de la rage des rues.

Quoi qu'il en soit, un fait apparaît certain, c'est que la négri-génèse néoplasique exige le développement de la tumeur dans le milieu spécial, éminemment rabigène, représenté par la

chambre antérieure de l'œil. Nulle part ailleurs, et en dépit de la pullulation des cellules cancéreuses et de la dispersion du virus rabique dans l'organisme, il ne nous a été donné de constater une semblable négrigénèse néoplasique. C'est que l'œil est, en réalité, une expansion du névraxe, et, de ce fait, un lieu sélectif pour la culture du germe de la rage. Seuls les épithéliums cancéreux se développant dans un tel milieu, permettent au virus d'extérioriser son potentiel négrigène.

CONCLUSIONS.

L'affinité du virus rabique des rues pour les neurones et les épithéliums cornéens, n'est pas particulière à ces systèmes tissulaires. Les cellules cancéreuses de la tumeur de Pearce réagissent de même. A la condition que ces cellules pullulent dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, l'ultragerme de la rage y accomplit son cycle évolutif parfait, aboutissant aux corps de Negri intra-cytoplasmiques. De ce point de vue, le virus rabique fixe se comporte différemment du virus de la rage des rues. Il est probable que si les éléments néoplasiques se prêtent à la négrigénèse, c'est qu'étant à l'état embryonnaire, ils renferment, en potentiel, certaines des propriétés fondamentales des cellules hautement différenciées, tels que les neurones et les épithéliums cornéens (12).

(12) Nous avons entrepris une série d'essais analogue avec le papilloma de Shoope et les cancers des souris ; nous y viendrons ultérieurement.

ACTION DE LA DILUTION SUR LES VIRUS RABIQUES DE RUE

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

(Institut Pasteur du Maroc, à Tanger.)

Nous avons, les premiers, attiré l'attention sur le fait que les chiffres exprimant la sensibilité du virus rabique fixe à la dilution, donnés par Högyès aux premiers temps de la méthode pasteurienne, devaient de nos jours être modifiés dans le sens d'une sensibilité beaucoup moindre, en voie de diminution avec le nombre des passages. Pour Högyès, la dilution à 1 p. 5.000 du virus fixe n'était pas toujours mortelle pour le lapin et la dilution à 1 p. 10.000 ne l'était jamais. En 1931, le virus fixe de Tanger était encore virulent à 1 p. 500.000, mais ne l'était plus à 1 p. 600.000. En 1934, ce même virus était encore actif à 1 p. 900.000, mais ne l'était plus à 1 p. 1.000.000. La même année, le virus fixe de l'Institut Pasteur de Beyrouth était encore actif à 1 p. 700.000, mais ne l'était plus à 1 p. 800.000 (1). Postérieurement, Kaktin a vu que la dose mortelle minima du virus fixe de Riga pour la dure-mère du lapin était donnée par une dilution à 1 p. 300 000 ; Lépine, Cruveilhier et Sautter ont vu que l'émulsion à 1 p. 10.000 de virus fixe de Paris était virulente une fois sur deux, l'émulsion à 1 p. 50.000 une fois sur six et que l'émulsion à 1 p. 100.000 était toujours inactive. L'écart entre ces chiffres et les nôtres peut trouver une explication dans le nombre des passages sensiblement moindre à Paris (1.522) qu'à Tanger (2.670) et aussi dans des différences de technique. A Tanger, nous employons uniquement (à l'exclusion des cerveaux de chiens et des cerveaux con-

(1) En 1936, le virus de l'Institut Pasteur de Tanger transporté à Beyrouth y a encore donné des résultats positifs avec des dilutions poussées jusqu'à 1 p. 900.000.

servés en glycérine) des cerveaux de lapins frais. 0 gr. 50 de substance cérébrale coupés dans l'écorce grise de la partie postérieure des hémisphères sont finement émulsionnés dans 50 cent. cubes d'eau physiologique. L'émulsion est abandonnée pendant quatre à cinq heures à la température du laboratoire, afin de permettre la diffusion du virus. On filtre sur papier pour éviter les grumeaux. 4 cent. cube de filtrat est porté dans 9 cent. cubes d'eau physiologique. Après homogénéisation prolongée, 1 cent. cube de cette dilution est à son tour porté dans 9 cent. cubes d'eau physiologique. On obtient ainsi une dilution de base à 1/10.000 qui va donner la dilution définitive, 1 cent. cube dilué dans 19 cent. cubes d'eau physiologique fournissant la dilution à 1/200.000, dans 29 cent. cubes à 1/300.000, etc. On inocule de chaque dilution de 1/4 à 1 cent. cube sous la dure-mère du lapin. Avant d'être injectées, les dilutions définitives doivent être homogénéisées avec le plus grand soin. A l'agitation à la baguette, on préférera des aspirations et des refoulements énergiquement répétés une vingtaine de fois à l'aide d'une seringue de 20 cent. cubes. L'exactitude du résultat et la possibilité de comparer ceux-ci d'un Institut à un autre sont fonction de l'observation rigoureuse des moindres détails de cette technique, fruit d'une longue et coûteuse expérimentation. Nous l'avons appliquée à l'étude de l'action de la dilution sur les virus de rue. Les données de la littérature médicale sur ce point particulier sont des plus restreintes. Nicolau, Mathis et M^{me} Constantinesco ont isolé, à Dakar, chez un enfant mort de Rage des rues, un virus autochtone qui, au quatrième passage, était virulent seulement à la dilution de 1/300 ; des dilutions à 1/1.000, à 1/2.000, à 1/3.000 étaient dépourvues de pouvoir pathogène. Au dix-huitième passage, la dilution de la substance cérébrale du lapin était virulente à 1/8.000, tandis que les dilutions à 1/10.000 et à 1/20.000 étaient avirulentes. Au quarantième passage, le virus était encore virulent à la dilution de 1/20.000. Un virus renforcé, isolé à Odessa par Palawandoff et Serebrennaya, tuait le lapin à 1/75.000 au lieu de 1/25.000 (virus fixe d'Odessa). Un autre virus renforcé, rencontré à Istamboul, chez un rat, par Zekai Muammer, était encore actif à 1/500.000. Nous

n'avons trouvé aucune autre indication dans les journaux et revues dont nous disposons et cette question n'a pas encore été l'objet d'une étude d'ensemble. Nos recherches personnelles ont porté sur divers virus de rue isolés au Maroc où les virus exaltés sont rares et où la rage se comporte comme en France et en Europe Occidentale.

1° VIRUS TANGÉROIS « DRADEB ».

Chienne métis-fox amenée à l'Institut en raison d'une agressivité subite. Elle s'est jetée sur tous les animaux à sa portée et a causé de nombreuses victimes. Elle a mordu un jeune domestique indigène qui est soumis immédiatement au traitement. La rage furieuse à la période d'état ne fait, en effet, aucun doute. L'animal admis à la fourrière de l'Institut succombe à l'évolution d'une courte phase paralytique. Présence de corpuscules de Negri dans les neurones de la corne d'Ammon. Le bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin le 13 décembre. Il présente quinze jours plus tard les premiers signes d'une paralysie progressive qui détermine la mort le dix-septième jour. L'étude de la dilution est entreprise avec le cerveau de ce lapin (premier passage à partir du chien).

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
100	1/10.000	1	+
50	1/5.000	0,25	+
25	1/10.000	0,25	—
10	1/100.000	1	—

2° VIRUS DE RABAT « SAINT ».

Chien abattu à Rabat dans les jardins d'un palais où il s'était introduit et avait mordu une chienne appartenant à un haut fonctionnaire du protectorat. La corne d'Ammon renfermait des corpuscules de Negri. Un lapin inoculé sous la dure-mère avec le bulbe fut atteint le dix-septième jour des pre-

miers symptômes d'une paralysie qui suivit une marche nettement ascendante et succomba le dix-huitième jour (24 janvier 1931). Depuis cette date, le virus est passé à Tanger une trentaine de fois par le cerveau du lapin pour les besoins des expériences. La régularité de l'incubation et de l'évolution de la maladie déclarée a souvent fait préférer ce virus à beaucoup d'autres.

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
200	1/5.000	1	+
100	1/10.000	1	+
66,6	1/15.000	1	+
20	1/50.000	1	+
10	1/100.000	1	+
8	1/125.000	1	—
5,71	1/175.000	1	—
3	1/200.000	1	—
2,2	1/225.000	0,5	—
1,80	1/275.000	0,5	—
1,66	1/300.000	0,5	—

3° VIRUS TANGÉROIS « ABRINES ».

Petite chienne roquet, très familière, devenue subitement indifférente à l'égard de ses maîtres. Elle attire sur elle l'attention par son inquiétude et son agressivité. Elle attaque un grand berger allemand, un coq, deux chats, avec lesquels elle vivait cependant en parfaite intelligence. L'inquiétude et l'agressivité ne font que croître pendant quatre jours au cours desquels 3 personnes sont mordues. C'est à la suite de ces in-

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	—
10	1/50.000	0,5	—
5	1/100.000	0,5	+
4	1/125.000	0,5	—
2,85	1/175.000	0,5	—
2,5	1/200.000	0,5	—
2	1/250.000	0,5	—

cidents que l'animal est amené à la fourrière; la chienne succombe quatre jours plus tard aux progrès de la paralysie. La corne d'Ammon renferme des corpuscules de Negri. L'urine contient une quantité massive de glucose. Un lapin inoculé avec l'émulsion du bulbe sous la dure-mère succombe seize jours plus tard à une forme paralytique de rage, pure de tout symptôme de fureur. C'est l'encéphale de ce lapin qui est employé pour l'étude de la dilution.

4° VIRUS DE GIBRALTAR.

Il s'agit d'un fox, mort à Gibraltar, et dont le cerveau a été envoyé à Tanger par le Service de Santé. Parvenu le 18 septembre 1934, il est inoculé sous la dure-mère d'un lapin qui succombe seize jours plus tard à une rage paralytique qui a débuté le douzième jour. Depuis un an et demi, ce virus a passé quatre fois par le lapin sans aucune modification de ses caractères. C'est ainsi que le lapin du quatrième passage dont le cerveau a servi à l'étude de la dilution a été atteint de paralysie le quatorzième jour et a succombé le seizième.

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	+
25	1/20.000	0,5	+
10	1/50.000	0,5	+
5	1/100.000	0,5	—

5° VIRUS TANGÉROIS « BOUGDOUR ».

Un grand pointer en très bon état, appartenant à un charcutier, attire l'attention de ses maîtres par des efforts de vomissements. Les liquides, l'eau en particulier, sont parfaitement déglutis, mais les solides sont rejetés aussitôt après leur ingestion. Les efforts de vomissement toujours très violents sont accompagnés d'angoisse. En dépit des souffrances, les facultés intellectuelles ne sont pas atteintes. Aucune agressivité. Le chien est mort subitement sans avoir présenté aucun

signe paralytique. L'autopsie révèle une œsophagite développée en amont et en aval d'un adénome spiroptérien. Les passages du bulbe ont montré que le chien était atteint d'une maladie mixte : association de la rage et de la spiroptérose. Un lapin inoculé sous la dure-mère a contracté une rage paralytique typique à laquelle il a succombé le onzième jour. C'est l'encéphale de ce lapin qui a été employé pour l'étude de la dilution.

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
250	1/2 000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	+
10	1/50.000	0,5	+
5	1/100.000	0,5	+
4	1/125.000	0,5	—
2,8	1/175.000	0,5	—
2,5	1/200.000	0,5	—
2	1/250.000	0,5	—

6° VIRUS TANGÉROIS « MOGHORA ».

Chien kabyle, errant, de grande taille, capturé par la fourrière municipale le 11 avril. Atteint de rage furieuse extrêmement violente le 13. Période d'état le 14. Mort paralysé le 15. Un lapin est inoculé sous la dure-mère avec son bulbe. Début le onzième jour d'une rage paralytique exempte de toute association de fureur ou d'agitation. Evolution lente, progressive, ascendante durant trois jours. Mort au cours du quinzième jour. C'est le cerveau de ce lapin de premier passage qui est utilisé :

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
500	1/1.000	0,5	+
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	+
10	1/50.000	0,5	—
5	1/100.000	0,5	—
4	1/125.000	0,5	—

7° VIRUS « MARIANI ».

Jeune berger allemand devenu subitement furieux. Il se jette, pour les attaquer, sur tous les chiens qui passent à sa portée. La bave s'écoule des commissures labiales. L'abolement rabique est caractéristique. Incarcéré à la fourrière de l'Institut, il ne tarde pas à présenter le jour même les premiers signes paralytiques. Le jour suivant, la paralysie est complète. Mort le troisième jour. Un lapin inoculé sous la dure-mère avec le bulbe, est pris quatorze jours plus tard et meurt le quinzième jour. L'encéphale de ce lapin (premier passage à partir du chien) est employé pour l'étude de la dilution :

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
500	1/1.000	0,5	+
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	+
10	1/50.000	0,5	—
5	1/100.000	0,5	—
4	1/125.000	0,5	—

8° VIRUS « PODENKO ».

Chien courant espagnol amené à l'Institut alors qu'il est atteint de rage mue du type maxillaire à la période d'état. Succombe le surlendemain aux progrès d'une paralysie pure de tout mélange de symptômes d'excitation. Présence de corpuscules de Negri dans la corne d'Ammon. Glycosurie élevée. Un lapin inoculé avec son bulbe présente, après une longue incubation de dix-sept jours, les premiers symptômes d'une paralysie à évolution lente qui détermine la mort le vingt-cinquième jour. Le cerveau de ce lapin est employé à l'étude de la dilution :

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
5 000	1/100	0,5	+
2.000	1/250	0,5	+
1.000	1/500	0,5	—
500	1/1.000	0,5	+
250	1/2.000	0,5	—
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	—
10	1/50.000	0,5	—

9° VIRUS DE LA RÉGION DE FÈS « GAFSHAÏ ».

Le cheval d'un cavalier indigène brise ses entraves au cours de la nuit, se jette sur 3 congénères et les mord cruellement ainsi que 2 hommes qui tentent de le maîtriser ; il se réfugie dans un réseau de fil de fer d'où il est impossible de le déloger : il y meurt subitement dans la journée. L'encéphale est envoyé à Tanger. Une émulsion de bulbe rachidien est inoculée sous la dure-mère d'un lapin qui est atteint onze jours plus tard des premiers symptômes d'une rage paralytique mêlée de signes d'excitation. Mort le douzième jour. C'est le cerveau de ce lapin (premier passage) qui est employé à l'étude de la dilution :

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
5.000	1/100	0,5	+
2.000	1/250	0,5	+
1.000	1/500	0,5	+
500	1/1.000	0,5	+
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	—
50	1/10.000	0,5	—
10	1/50.000	0,5	—

10° VIRUS TANGÉROIS « PERRERA ».

Un métis fox, âgé de trois ans, est atteint de la rage furieuse la plus typique. Extrêmement agressif, il s'attaque avec une violence extrême à tous les objets qui sont à sa portée. Il meurt subitement au cours d'une crise de fureur. Un lapin est

inoculé sous la dure-mère avec une émulsion du bulbe. Début le treizième jour d'une rage paralytique pure de tout mélange de fureur ; mort le seizième jour. Le cerveau de ce lapin (premier passage) est utilisé pour l'obtention des dilutions suivantes :

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RÉSULTATS
5.000	1/100	0,5	+
2.000	1/250	0,5	+
1.000	1/500	0,5	+
500	1/1 000	0,5	+
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5.000	0,5	+
50	1/10.000	0,5	+
10	1/50.000	0,5	—

41° VIRUS TANGÉROIS « SOUANI ».

Un petit loulou, âgé de dix ans, attire l'attention par le refus de la nourriture et la position pendante du maxillaire. Incarcéré à la fourrière de l'Institut, il présente, le soir même, des signes de fureur très accusés. Entièrement paralysé le lendemain, il succombe le jour suivant. Un lapin inoculé sous la dure-mère avec une émulsion du bulbe est atteint de la rage le dix-septième jour et meurt le dix-neuvième jour. Un deuxième passage est effectué par le lapin : début le treizième jour, mort le seizième jour. C'est le cerveau de ce lapin (deuxième passage) qui sert à étudier la dilution :

POIDS en millièmes de milligramme inoculé	TAUX des dilutions	VOLUME inoculé	RESULTATS
2.000	1/250	0,5	+
1.000	1/500	0,5	+
500	1/100	0,5	+
250	1/2.000	0,5	+
100	1/5 000	0,5	+
50	1/10 000	0,5	+
10	1/50 000	0,5	+
8,4	1/60.000	0,5	+
5	1/100.000	0,5	+
4	1/125.000	0,5	—
3,33	1/150 000	0,5	—
2,85	1/175.000	0,5	—
2,5	1/200.000	0,5	
1,66	1/300 000	0,5	

En résumé, pour les 11 virus de rue examinés ; le taux minimum actif des dilutions a été : $1/2.000$, une fois ; $1/5.000$, deux fois ; $1/10.000$, trois fois ; $1/30.000$, une fois ; $1/100.000$, quatre fois. Nous désirons faire remarquer que cette notion du taux des émulsions paraît importer beaucoup moins que celle du poids de la substance cérébrale inoculée. C'est moins le mode de répartition dans un liquide de la matière solide qui supporte la virulence que la quantité absolue de cette matière solide qu'il est intéressant de connaître ; aussi, est-ce aux poids qu'est consacrée la première colonne des tableaux qui précèdent et est-ce uniquement pour nous conformer à un usage classique en bactériologie que nous continuons à nous exprimer par taux. Pour les 11 virus de rue que nous avons expertisés, le poids actif minimum a été : de 250 millièmes de milligramme, une fois ; de 100 millièmes de milligramme, une fois ; de 50 millièmes de milligramme, quatre fois ; de 10 millièmes de milligramme, deux fois ; et de 5 millièmes de milligramme, trois fois. Ceci étant, si nous revenons un instant sur l'action de la dilution à l'égard du virus rabique fixe, nous voyons que des passages de lapin à lapin, résulte une adaptation de plus en plus étroite du virus rabique à l'encéphale, c'est-à-dire, selon toute vraisemblance, la présence d'une quantité de plus en plus élevée de principes pathogènes dans l'unité de poids. Il s'ensuit que la dilution exerce, sur l'activité des émulsions, une influence de moins en moins marquée puisque le nombre des germes augmente de plus en plus. D'où l'activité de ce virus fixe à des dilutions à $1/500.000$; à $1/700.000$, à $1/900.000$. On était en droit de supposer, dans ces conditions, qu'étudiant, en 1936, l'action de la dilution à l'égard des virus de rue, on allait se trouver ramené à l'époque d'Högyès, c'est-à-dire à ce qu'étaient les virus fixes au moment de leurs premiers passages par le lapin. On était en droit de supposer, par conséquent, que les chiffres exprimant l'action de la dilution sur les virus expertisés seraient tous voisins de $1/5.000$. L'expérience a démontré l'inexactitude de ces suppositions, puisque, sur 11 virus étudiés, 6 seulement se sont montrés virulents à des taux de $1/2.000$, $1/5.000$ ou $1/10.000$. Comment expliquer ce résultat paradoxal ? Par des différences entre la technique suivie par Högyès et celle adop-

tée par nous-mêmes ? En partie, peut-être, mais en partie seulement. A condition de définir avec Maurice Nicolle et Césari la virulence « végétabilité *in vivo* », il est plus vraisemblable d'admettre que l'écart entre les chiffres trouvés ($1/2.000$ à $1/100.000$) correspond à des écarts qui existent dans la nature, dans la virulence des différentes souches rabiques. Certaines souches se comportent d'emblée à l'égard de la dilution comme des virus ayant passé des centaines de fois par le cerveau du lapin ; certaines autres, comme des virus vierges encore de tout passage. Le hasard a fait qu'Högyès, au début de la méthode pasteurienne, est parti d'un virus du type des virus tangérois Drabeb et Mariani alors qu'il aurait, tout aussi bien, pu le faire tomber sur un virus du type Abrinès ou Bougdour..., voire sur un virus du type Gafshaï.

Nous ferons remarquer en terminant que, si, par virulence on entend moins la « végétabilité *in vivo* » que le pouvoir agressif ou pathogène, une concordance entre le taux auquel sont actives les dilutions des divers virus rabiques et leur nocivité pour l'homme, paraît très improbable. Quelle personne, avertie des choses de la rage, ne préférerait en effet être mordue par un chien atteint de rage à virus fixe (actif jusqu'à $1/900.000$) plutôt que par un chien atteint d'une rage du type Drabeb ou Mariani (virus actif jusqu'à $1/10.000$) ? L'intérêt de l'étude de l'action de la dilution sur les virus de rue apparaît ainsi d'ordre doctrinal plutôt que pratique... Et c'est le cas de rappeler les réserves de l'un de nous (2) au sujet du danger pour l'homme des virus « renforcés » pour le lapin et de la légitimité d'expliquer par ce renforcement certains échecs du traitement pasteurien.

(2) P. REMLINGER. Les virus rabiques renforcés peuvent-ils rendre compte de certains échecs du traitement pasteurien ? *Soc. de Biol.*, 7 mars 1925.

DISTINCTION DE QUATRE TYPES SÉROLOGIQUES PARMI LES BACILLES TUBERCULEUX DU GROUPE AVIAIRE

par W. SCHAEFER.

*(Institut Pasteur.
Laboratoire de Recherches sur la tuberculose.)*

L'analyse de la spécificité sérologique des microbes pathogènes, ou non pathogènes, est devenue une des méthodes les plus importantes pour caractériser le nombre toujours croissant des espèces bactériennes et pour préciser leur structure ainsi que le mécanisme particulier de leurs actions biologiques. Dans le domaine des bacilles acido-résistants, les recherches poursuivies sur ce sujet sont encore assez peu avancées. Non seulement les bacilles acido-résistants saprophytes et les bacilles tuberculeux des animaux à sang froid n'ont pas été soumis à une étude sérologique approfondie, permettant de délimiter les espèces existantes, mais encore les bacilles tuberculeux virulents des trois types classiques : humain, bovin et aviaire sont insuffisamment différenciés en ce qui concerne leurs caractères sérologiques. Malgré les différences biologiques certaines qui existent entre les bacilles humains et bovins, tous les essais effectués en vue de mettre en évidence des différences sérologiques entre ces deux types ont échoué. Quant au bacille aviaire, G. S. Wilson [1] et A. Stanley Griffith [2] (1923), indépendamment l'un de l'autre, ont montré qu'il existe des différences sérologiques entre cette espèce et les autres bacilles tuberculeux des mammifères. La méthode d'agglutination des suspensions bacillaires par des sérums anti-aviaires leur ayant donné des résultats très irréguliers, en raison de la difficulté qu'on éprouve assez souvent pour mettre des bacilles tuberculeux en suspension parfaitement stable, les auteurs ont essayé de distinguer les types bacillaires d'après leur pouvoir

absorbant vis-à-vis des agglutinines des sérums anti-aviaires. Tandis que les bacilles humains et bovins absorbent seulement une partie des agglutinines des sérums anti-aviaires, les souches aviaires absorbent tous les anticorps de ces sérums.

G. S. Wilson a insisté cependant sur la nécessité de répéter à plusieurs reprises l'absorption avec la même souche avant de conclure à l'existence certaine de son pouvoir absorbant, une seule absorption étant souvent incomplète. I. Furth [3] (1926), reprenant les expériences de G. S. Wilson et de A. S. Griffith, a constaté que la réaction de la fixation du complément, combinée avec la méthode de l'absorption des anticorps de groupe, donne des résultats supérieurs à ceux de l'agglutination. Il confirme que les bacilles aviaires sont sérologiquement distincts des bacilles des mammifères et il conclut que ces germes ne forment pas un groupe homogène, mais qu'ils sont composés d'au moins trois types sérologiquement différents. Les recherches sont fondées sur l'étude de six souches aviaires isolées de cas d'infections spontanées des oiseaux et de quatre souches aviaires de provenances diverses (2 « b. de la lèpre » de Duval et Kedrowski, une souche dite humaine avirulente et la souche homogène d'Arloing).

Nous nous sommes posé le problème de la spécificité sérologique des bacilles aviaires lorsque nous avons entrepris de classer les nombreuses souches d'apparence aviaire qui avaient été isolées dans les laboratoires de la tuberculose à l'Institut Pasteur au cours de recherches très variées (études sur l'ultra-virus tuberculeux (1), essais de dissociation *in vivo* de bacilles tuberculeux (2), isolement de souches lisses à partir de produits pathologiques humains inoculés au cobaye (3), etc.). Il importe de remarquer que dans presque tous les cas c'est à partir des organes de cobayes, que de telles souches de type aviaire ont été isolées. Comme A. Saenz, L. Costil et M. Sadettin [4] l'ont montré, ces souches se trouvent aussi chez les cobayes neufs ayant séjourné pendant quelque temps dans les cages et plus

(1) J. VALTIS et F. VAN DEINSE. Ces *Annales*, **51**, 1933, p. 419, **53**, 1934, p. 51.

(2) K. BIRKHAUG. Ces *Annales*, **54**, 1935, p. 19.

(3) A. SAENZ et L. COSTIL. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 1263 ; *La Presse Médicale*, 1934, p. 1827.

fréquemment encore chez les cobayes ayant reçu des injections répétées de produits stériles. Dans un cas, étudié par U. Battaglini [5], c'est un cobaye récemment introduit dans notre réserve d'animaux qui fut trouvé porteur d'une de ces souches. A. Saenz et ses collaborateurs ont classé celles-ci en deux groupes : le premier ayant des caractères typiques des bacilles aviaires, en particulier la virulence pour la poule et le lapin ; le deuxième ne se montrant virulent pour la poule et le lapin, qu'à des doses très élevées (1 à 10 milligrammes) ou étant même totalement avirulent. Nous avons recherché si les méthodes sérologiques permettent de mettre en évidence des caractères spécifiques différentiels des souches en question.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE.

La méthode que nous avons employée est la réaction de fixation du complément associée à la méthode de l'absorption des anticorps fixateurs.

Nous avons préparé des antisérums en injectant à des lapins, deux fois par semaine, 5 à 10 milligrammes d'une suspension de bacilles aviaires cultivés sur milieu de Löwenstein ou sur pomme de terre, et stérilisés pendant une heure au bain-marie à 80°. Les animaux sont saignés après 8 à 10 injections et leur sérum est stérilisé en ajoutant 0 c. c. 6 pour 10 cent. cubes de sérum de la solution suivante : Acide phénique 5 grammes, Glycérine 5 grammes, Eau physiologique 100 cent. cubes. Les sérums ainsi traités conservent indéfiniment leur activité.

Pour la réaction de fixation du complément nous nous sommes servi, comme antigène, d'une suspension bacillaire en eau physiologique préparée de la manière suivante :

On prélève avec une petite spatule environ 2 milligrammes de la culture vivante ou préalablement stérilisée par chauffage à 80° en atmosphère humide et on l'émulsionne contre les parois d'un tube de verre contenant 10 cent. cubes d'eau physiologique. Les suspensions des différentes souches sont amenées à la même densité optique en utilisant, comme émulsion standard, une suspension de staphylocoques en eau physiologique contenant 300.000.000 de germes par centimètre cube. Ces suspensions ne possèdent aucun pouvoir anti-complémentaire et peuvent être conservées à la glacière sans inconvénients pendant plusieurs jours.

Les souches servant à la préparation des suspensions peuvent être cultivées indifféremment sur le milieu de Löwenstein ou sur pomme de terre. Dans le cas seulement où il s'agit de souches aviaires prenant un aspect rugueux en culture sur pomme de terre, il est indispensable de se servir de cultures sur milieu de Löwenstein, car sur ce milieu toutes les souches aviaires prennent un aspect lisse et sont facilement émulsionnables.

Au cours de nos expériences, nous avons très souvent utilisé comme antigène, au lieu d'émulsions bacillaires, des extraits alcooliques des bacilles préparés selon le procédé que A. Boquet et L. Nègre ont mis au point pour la préparation de l'antigène méthylique tuberculeux. Ces antigènes sont dilués (suivant leur pouvoir empêchant et leur activité), de quinze à trente fois avec de l'eau physiologique en ajoutant l'eau goutte à goutte à la solution alcoolique.

La réaction de fixation du complément est effectuée de la façon suivante :

Des doses décroissantes d'antisérum (1/10 : 0,25 - 0,15 - 0,1 ; 1/50 : 0,25 - 0,15 - 0,1 ; 1/250 : 0,25, etc.) amenées au volume constant de 0 c. c. 25, sont mélangées avec 0 c. c. 25 de l'antigène (émulsion bacillaire ou antigène méthylique) et avec 0 c. c. 25 d'alexine diluée au 1/15. On met les mélanges pendant une heure à l'étuve, puis on ajoute 0 c. c. 5 d'un mélange à parties égales de sérum hémolytique (5 doses minima lysantes) et de globules rouges à 5 p. 100. On note les résultats après une demi-heure de séjour à l'étuve lorsque la réaction est complètement achevée.

Dans les expériences d'absorption des anticorps, nous procédons de la façon suivante :

100 milligrammes de corps bacillaires tués par la chaleur, desséchés et pulvérisés sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique. On les émulsionne dans 10 à 15 centimètres cubes de l'antisérum préalablement inactivé et dilué (au 1/5 ou au 1/20 selon son titre), et on porte le mélange à l'étuve en l'agitant toutes les dix minutes. Puis on le met à la glacière pendant au moins un quart d'heure ou jusqu'au lendemain ; on centrifuge fortement jusqu'à éclaircissement complet, on décante et on inactive le sérum encore une fois par chauffage à 56° pendant cinq minutes. Les sérums ainsi traités n'ont aucun pouvoir empêchant, et on les dilue pour la réaction de fixation du complément, comme les sérums non absorbés.

I. — Sérum anti-aviaire LI.

SÉRUM	SUSPENSION						
	Av. NI	Av. AII	Av. LI	Av. PII	Cob. Ba III	Hum.	P.
A. Non absorbé :							
1/10 0,25	+	+	+	+	+	+	+
0,15	+	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	+	+
1/100 0,25	+	+	+	+	+	p	—
0,15	+	+	+	+	—	—	—
0,1	+	+	+	p	—	—	—
1/500 0,25	—	—	—	—	—	—	—
B. Absorbé avec Bov. Vallée :							
1/20 0,25	+	+	+	+	+	—	—
0,15	+	+	+	+	—	—	—
0,1	+	+	+	+	—	—	—
1/100 0,25	+	—	+	—	—	—	—
0,15	p	—	p	—	—	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—	—
C. Absorbé avec B. Cob. Va III :							
1/20 0,25	+	+	+	+	—	—	—
0,15	+	+	+	+	—	—	—
0,1	+	+	+	+	—	—	—
1/100 0,25	+	—	+	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—	—
D. Absorbé avec Av. II :							
1/20 0,25	+	—	+	—	—	—	—
0,15	+	—	+	—	—	—	—
0,1	+	—	+	—	—	—	—
1/100 0,25	p	—	+	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—	—
E. Absorbé avec Av. NI :							
1/20 0,25	+	—	+	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—	—

+, fixation complète; p, hémolyse partielle; —, hémolyse complète.

ÉTUDE SÉROLOGIQUE DES SOUCHES AVIAIRES.

Dans les tableaux I à IV nous rapportons quelques exemples caractéristiques du comportement des antisérums préparés

II. — Sérum anti-aviaire NI.

NI	Av. AII	Av. LI	Av. PII	Cob. BaIII	Hum.	Bov.
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
p	p	+	p	p	p	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
+	+	+	+	+	—	—
+	+	+	+	—	—	—
+	+	+	+	—	—	—
+	+	+	—	—	—	—
+	—	—	—	—	—	—
+	+	+	+	—	—	—
+	+	+	p	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—

avec différentes souches aviaires typiques : 1° vis-à-vis d'émulsions de germes homologues ; 2° vis-à-vis de bacilles appartenant à d'autres souches aviaires typiques (désignées par le signe Av. I ou Av. II ; 3° vis-à-vis de certaines souches d'as-

III. — Sérum anti-aviaire A II.

SÉRUM	SUSPENS						
	Av. A II	Av. N I	Av. P II	Av. L I	Cob. Ba III	Hum.	Bo
A. Non absorbé :							
1/30 0,25	+	+	+	+	+	+	+
0,15	+	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	+	+
1/150 0,25	+	+	+	p	—	—	p
0,15	+	—	+	—	—	+	—
0,1	—	—	—	—	—	—	—
B. Absorbé avec Bov. Vallée :							
1/30 0,25	+	+	+	+	—	—	—
0,15	+	+	+	+	—	—	—
0,1	+	+	+	+	—	—	—
1/150 0,25	+	—	+	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—	—
C. Absorbé avec Cob. Va III :							
1/30 0,25	—	+	+	+	—	—	—
0,15	+	+	+	+	—	—	—
0,1	+	+	+	+	—	—	—
1/150 0,25	+	—	+	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—	—
D. Absorbé avec N I :							
1/30 0,25	+	+	+	+	—	—	—
0,15	+	—	+	—	—	—	—
0,1	+	—	+	—	—	—	—
1/150 0,25	p	—	p	—	—	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—	—
E. Absorbé avec Av. P II :							
1/30 0,25	—	—	—	—	—	—	—

pect aviaire, isolées de cobayes et avirulentes (désignées par le signe Cob. III; et enfin, 4° vis-à-vis de souches humaines ou bovines.

La première colonne horizontale (A) de chaque tableau représente les réactions données par les antisérums à l'état non absorbé ; la deuxième (B), les réactions après absorption des

V. — Sérum anti-aviaire NI.

SÉRUM	SUSPENSIONS BACILLAIRES						
	Av. A II	Av. NI	Av. P II	Av. LI	Cob. Ba III	Hum.	Bov.
<i>Non absorbé.</i>							
1/10 0,25 . . .	—	+	—	+	—	—	—
0,15 . . .	—	+	—	+	—	—	—
0,1 . . .	—	+	—	+	—	—	—
1/50 0,25 . . .	—	—	—	—	—	—	—

Il ressort de la lecture de ces tableaux que les sérums anti-aviaires non absorbés réagissent assez souvent avec les souches d'autres espèces acido-résistantes presque au même degré qu'avec les souches homologues (tableaux III et IV). A l'except-

VI. — Sérum cobaye 545.

SÉRUM	ANTIGÈNES MÉTHYLIQUES				
	Cob. 545 III	Cob. Ba III	Av. NI	Av. A II	Bov.
<i>A. Non absorbé :</i>					
1/25 0,1	+	+	+	+	+
1/125 0,25	+	+	+	+	+
0,15	+	p	+	+	+
0,1	—	—	—	—	—
<i>B. Absorbé avec Bov. Vallée :</i>					
1/5 0,15	+	+	+	p	—
0,1	+	+	—	—	—
1/25 0,25	+	+	—	—	—
0,15	+	—	—	—	—
0,1	—	—	—	—	—
<i>C. Absorbé avec Av. NI :</i>					
1/5 0,15	+	+	—	—	—
0,1	+	+	—	—	—
1/25 0,25	+	+	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—
<i>D. Absorbé avec cob. Va III :</i>					
1/5 0,15	—	—	—	—	—

VII. — Sérum Del.IV.

SÉRUM	SUSPENSIONS BACILLAIRES					
	Del.IV	Dem.IV	Av. DI	Av. PII	Cob. BaIII	Bov.
1/20 0,1 . . .	+	+	—	—	—	—
1/100 0,25 . . .	+	+	—	—	—	—
0,15 . . .	+	+	—	—	—	—
0,1 . . .	—	—	—	—	—	—

tion du sérum étudié dans le tableau V, ils ne possèdent donc qu'une spécificité très faible ou pas de spécificité, ce qui rend inutile leur emploi pour l'identification sérologique d'une souche aviaire. Les résultats changent cependant, si on se sert de sérums qui ont été traités préalablement, selon la méthode de l'absorption des anticorps, par des bacilles d'une souche acido-résistante hétérologue. Les sérums traités par des souches humaines ou bovines (colonne horizontale B) ne réagissent plus, ou réagissent très faiblement, avec les souches hétérologues du type humain ou bovin, mais ils réagissent encore avec les souches d'aspect aviaire. Parmi celles-ci les réactions avec les souches du type III sont, en général, plus faibles que celles des autres types aviaires et disparaissent même entièrement si on fait absorber préalablement les antisérums aviaires par des émulsions bacillaires de ce troisième type (colonne horizontale C). Ces souches du troisième type sont donc sérologiquement différentes des autres souches aviaires. Leur spécificité propre sera étudiée plus loin.

De même, les antisérums aviaires, absorbés par des bacilles des souches humaines, bovines ou du type Cobaye III, ne réagissent pas d'une façon identique avec les différentes souches aviaires typiques. Ainsi, les sérums préparés avec les souches aviaires LI et NI, absorbés par des bacilles du type III, réagissent plus fortement avec ces mêmes souches LI et NI qu'avec les souches aviaires AII et PII, et les sérums préparés avec les souches AII et PII réagissent plus fortement avec les souches AII et PII qu'avec les souches LI et NI. Il semble donc qu'il y ait encore, indépendamment de certaines réactions communes entre tous les bacilles aviaires, une spécificité plus étroite pour

certain types de ces bacilles. Cela devient tout à fait évident quand on fait des expériences d'absorption avec des germes appartenant aux différentes souches aviaires typiques (colonnes horizontales D et E). Ces expériences montrent, par exemple, que l'antisérum de la souche LI (tableau I) absorbé par la souche AII a perdu sa faculté de réagir avec les souches AII et PII, mais qu'il a conservé son activité vis-à-vis des souches LI et NI. Le même sérum LI, absorbé par les souches LI ou NI, par contre, a perdu son activité vis-à-vis de toutes les souches aviaires, sans exception.

Un autre antisérum de la souche AII (tableau III), absorbé comme le sérum précédent par les souches AII ou PII, devient tout à fait inactif, tandis que, absorbé par les souches NI ou LI, il perd seulement son activité vis-à-vis de ces deux souches, et il continue de réagir avec les souches AII et PII. Des expériences analogues sont rapportées dans les tableaux III et IV.

Les antisérums aviaires contiennent donc, indépendamment des anticorps communs aux bacilles acido-résistants, en général, et aux bacilles du groupe aviaire, en particulier, des anticorps tout à fait spécifiques pour le type du bacille aviaire qui a servi à leur préparation. Ces anticorps spécifiques ne peuvent être absorbés que par des bacilles du même type, tandis que les bacilles des autres types et des autres espèces acido-résistantes absorbent seulement les anticorps de groupe. On obtient donc un antisérum aviaire fortement spécifique pour le type homologue, par l'absorption de ce sérum avec des bacilles d'un type aviaire hétérologue. Cette constatation ne s'applique pas seulement aux bacilles aviaires du type I et II, mais est également valable pour les bacilles du type III. Le tableau VI montre par exemple qu'un antisérum du type III, non absorbé, réagit avec deux antigènes méthyliques du type III, au même taux qu'avec les antigènes méthyliques préparés soit avec d'autres types aviaires, soit avec une souche bovine. Il se montre au contraire tout à fait spécifique pour le type homologue quand on le fait absorber par un bacille bovin ou aviaire d'un type différent. Dans le tableau VII, nous ajoutons enfin l'antisérum d'un quatrième type rencontré parmi les souches possédant les caractères cultureux du bacille aviaire-type, mais qui possède également un antisérum tout à fait spécifique.

Les antisérums aviaires contiennent donc en général trois anticorps différents : un anticorps de groupe qui réagit avec tous les bacilles acido-résistants ; un anticorps commun à tous les types du groupe aviaire, et un anticorps spécifique pour le type spécial auquel appartient la souche qui a servi à la préparation de l'antisérum utilisé. Etant donné l'existence de ces trois anticorps, on peut donc admettre, dans chaque bacille aviaire, l'existence de trois antigènes différents : un antigène du groupe acido-résistant, un antigène du groupe aviaire et un antigène spécifique pour le type particulier auquel appartient le bacille étudié. Lequel de ces trois antigènes est l'antigène dominant ? Il ne fait aucun doute que c'est l'antigène de type. Nous l'avons rencontré constamment dans les 94 souches aviaires que nous avons examinées (4), et il a manifesté sa présence, par la production d'anticorps spécifiques pour le type, dans toutes les souches qui ont été employées pour la préparation des antisérums. L'antigène du groupe aviaire est beaucoup moins important et parfois il peut même faire défaut. Les tableaux IV et V montrent, par exemple, deux antisérums qui, après absorption par des souches humaines ou bovines ou même non absorbés, réagissent d'emblée d'une façon spécifique pour le type correspondant et qui n'offrent presque aucune réaction avec les bacilles du type hétérologue. L'antigène du type est donc celui qui peut le mieux servir à caractériser les souches aviaires, et c'est sa présence qui nous a permis de classer les souches d'aspect aviaire en quatre types sérologiquement distincts.

CARACTÈRES CULTURAUX ET BIOLOGIQUES DES QUATRE TYPES AVIAIRES.

Les recherches sérologiques précédentes nous ont permis d'entreprendre une étude plus détaillée des propriétés culturelles et biologiques de ces quatre types. Il s'agissait, en particulier, de préciser s'il existe, indépendamment de la spécifi-

(4) Nous exprimons tous nos remerciements à MM. A. et P. Boquet, L. Nègre, P. Armand-Delille, A. Saenz, F. Van Deinse, K. Birkhaug, U. Battaglini et R.-K. Goyal qui ont bien voulu mettre à notre disposition une partie des souches qui ont fait l'objet de ces recherches.

cité sérologique, d'autres caractères qui permettraient d'identifier et de distinguer ces différents types et de déterminer quelles sont les propriétés qui les relient entre eux. Le premier fait qui découle de nos recherches est que toutes les souches aviaires isolées d'oiseaux tuberculeux, et que nous avons

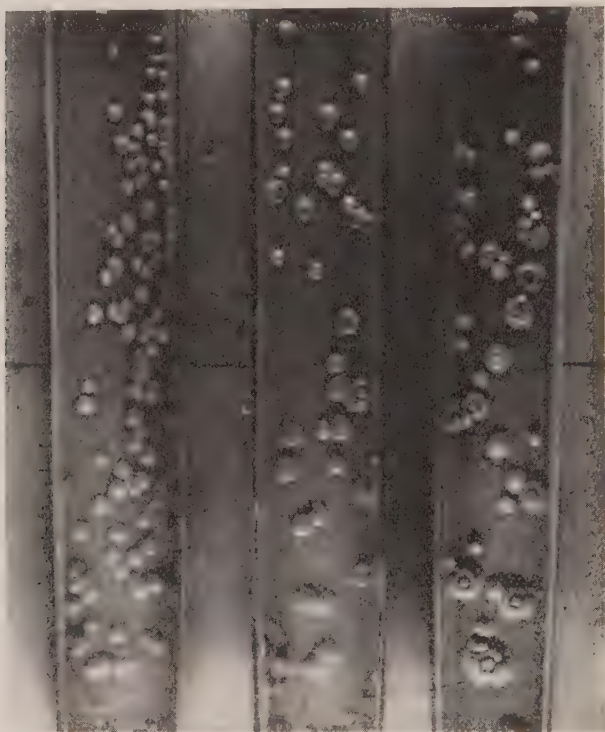


FIG. 1. — Souche aviaire du type II (donnant des cultures rugueuses sur pomme de terre glycinée) ensemencée en suspensions diluées sur le milieu de Löwenstein. Colonies petites et hémisphériques sur les tubes ensemencés avec les suspensions les plus épaisses (à gauche), grandes colonies en forme de marguerite sur les tubes ensemencés avec les suspensions très diluées (à droite).

étudiées, appartiennent, sans exception, au type I ou au type II. Sur 34 souches provenant d'oiseaux tuberculeux, 17 réagissaient avec les antisérums du type I et 17 avec les antisérums du type II. Mais ces types se trouvent aussi en grand nombre parmi les souches isolées de l'organisme du cobaye. Ainsi,

sur 59 souches isolées de cobayes, 16 appartiennent au type I, et 18 au type II.

La virulence des souches des types I et II est très variable. On trouve parmi elles des souches de virulence élevée qui tuent la poule en quatre semaines environ à la dose

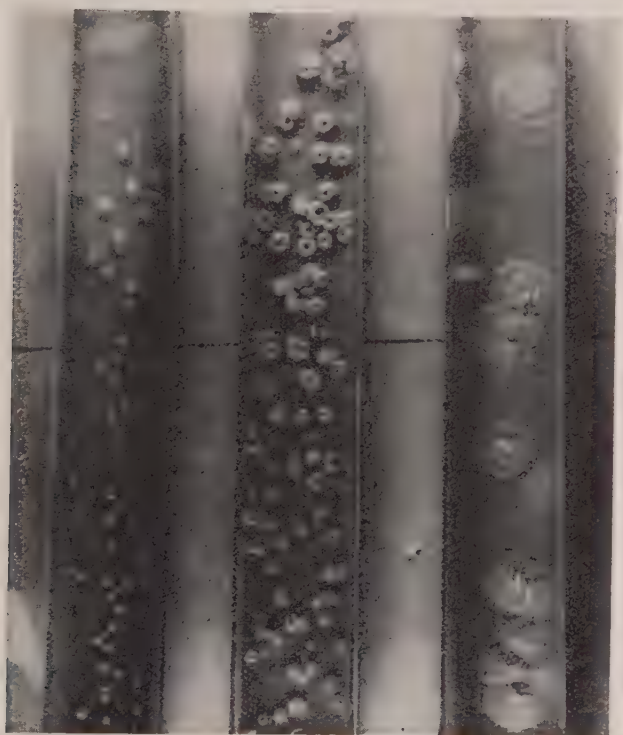


FIG. 2. — Autre souche aviaire du type II ayant les mêmes caractères que celle représentée dans la figure 1.

de 0 milligr. 01 par voie veineuse, en donnant un tableau de tuberculose nodulaire miliaire. Des doses de 1 milligramme et plus entraînent une mort plus rapide en produisant une tuberculose du type Yersin. Par contre, d'autres sont moins virulentes et ne produisent qu'à forte dose une tuberculose miliaire ou du type Yersin ; d'autres encore, injectées à des doses énormes de 10 à 20 milligrammes sont entièrement avirulentes pour la poule et le lapin.

Quant à leurs cultures, ces souches possèdent tous les caractères typiques des souches aviaires. Elles forment, en général, sur les milieux une souche crémeuse, lisse, mais, parfois, elles se dissocient sur la pomme de terre glycé-rinée, en variantes rugueuses ayant un aspect granuleux et sec. Ensemencées en suspensions très diluées sur le milieu de Löwenstein, elles s'y développent, en général, sous forme



FIG. 3. — Subculture de la souche présentée dans la figure 2.
Nouveau changement de l'aspect des colonies.

de petites colonies hémisphériques à surface lisse et à bords réguliers et qui conservent en général la même taille. Cependant, certaines souches, surtout parmi celles qui prennent sur la pomme de terre glycinée un aspect rugueux, donnent parfois aussi des colonies très étalées, et à surface ondulée, ou bien en forme d'anneau ou de rosette. Cet aspect des colonies ne caractérise pas néanmoins toutes ces souches d'une manière constante, car on trouve sur les différents tubes ensemencés en même temps des colonies d'aspect fort diffé-

rent. Les figures 1 et 2 montrent, par exemple, deux souches aviaires du type II, entretenues depuis plusieurs années sur pomme de terre glycerinée, et ayant acquis sur ce milieu un



FIG. 4. — Culture de deux souches du type III.
Aspect polymorphe des colonies (Gros 2 : 1).

aspect assez rugueux. Ces souches,ensemencées en suspension diluée sur le milieu de Löwenstein, présentent l'aspect caractéristique des colonies du bacille aviaire dans les tubes contenant de nombreuses colonies ; mais si on ensemence des dilu-

tions plus fortes, on obtient des aspects de colonies très différents. L'inconstance de la morphologie des colonies est également illustrée par la figure 3 où on voit des colonies sur milieu de Löwenstein de la souche représentée dans la figure 2 et qui a subi trois nouveaux passages sur pomme de terre glycinée. Les colonies ont pris de ce fait un aspect différent.



FIG. 5. — Souche aviaire du type I. A gauche : grandes colonies muriformes (premier isolement à partir de l'organisme de cobaye. Nous devons ce tube de culture à l'amabilité de M. Saenz). A droite : petites colonies hémisphériques du type aviaire de la subculture obtenue par ensemencement en suspensions très diluées sur le milieu de Löwenstein.

La variabilité de la forme des colonies est très marquée pour les souches du troisième type. Quand on ensemence ces souches en suspensions très diluées, on obtient dans le même tube, à côté de colonies petites et hémisphériques identiques à celles des bacilles aviaires typiques des types I et II, des colonies plus grandes, étalées, à surface ondulée, muriformes ou présentant l'aspect d'une marguerite avec un bouton central (2 souches

de ce troisième type sont représentées dans la figure 4). Les cultures offrent ainsi un aspect très polymorphe, et c'est là un caractère différentiel d'assez grande valeur pour reconnaître, par le seul examen des cultures, les souches du troisième type. Il est cependant évident que la confusion avec les colonies atypiques des types I et II est très possible. A. Saenz, L. Costil et M. Sadettin, dans leur étude sur le « nouveau type de bacille acido-résistant, parasite du cobaye neuf », qui



FIG. 6. — Souche du type IV. A gauche, colonies obtenues par isolement à partir de l'organisme d'un cobaye inoculé. A droite : colonies obtenues par l'ensemencement de cette souche en suspensions diluées sur le milieu de Löwenstein.

est celui que nous appelons type III (5), ont fait la même constatation, mais ils pensent que l'aspect des colonies de premier isolement à partir de l'organisme animal serait plus caractéristique par son polymorphisme que celui des subcultures. Nous avons cependant rencontré une souche du type I isolée d'un cobaye par A. Saenz, qui, au premier isolement, présentait un aspect semblable à celui des souches du type III, mais qui

(5) La première description des caractères bactériologiques et sérologiques de ce type se trouve dans nos communications « Sur un type particulier de bacilles acido-résistants isolés de l'organisme du cobaye ». *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1935, p. 961 et 1086.

donna des petites colonies hémisphériques caractéristiques des souches aviaires du type I ou II quand elle fut réensemencée en suspension très diluée (fig. 5). Dans ce cas, les repiquages ont donc donné des colonies d'un aspect plus caractéristique que celui de la culture initiale. Ce fut également le cas pour une souche du type IV isolée par P. Armand-Delille (fig. 6) dont la culture obtenue à partir des organes d'un cobaye inoculé, était composée de grandes colonies à surface ondulée, tandis que l'ensemencement de la culture de cette souche en suspensions diluées donnait naissance à des colonies uniformément hémisphériques. La morphologie des colonies ne peut donc pas servir de base sûre, pour la différenciation des types aviaires.

Il nous reste à rechercher si l'étude du pouvoir pathogène des souches du troisième type constitue un bon caractère différentiel vis-à-vis des souches des autres types. Tous les auteurs qui ont étudié la virulence des souches de ce type (A. Saenz, L. Costil et M. Sadettin [4, 12, 13], U. Battaglini [5], J. Valtis et F. van Deinse [15], et nous-même [4] ont constaté qu'elles se distinguent des souches aviaires classiques par leur pouvoir pathogène faible ou nul pour la poule et le lapin. Aucune souche de ce type ne s'est montrée capable de tuer la poule et le lapin par injection intra-veineuse à des doses inférieures à 0 milligr. 1. Par contre, les très fortes doses, de 1 à 10 milligrammes, provoquent assez souvent la mort des animaux au bout de quelques semaines, donnant une septicémie du type Yersin caractérisée par la congestion du foie et de la rate, la présence de bacilles plus ou moins nombreux dans les organes, l'amaigrissement et, parfois chez le lapin, la présence de granulations sur les poumons (A. Saenz et ses collaborateurs [13], J. Bablet, J. Valtis et F. Van Deinse [15], W. Schaefer [7]).

A. Saenz, qui a étudié l'action pathogène de 14 souches de ce type, conclut qu'à « doses massives, 1 à 10 milligrammes par voie veineuse, leur action peut être confondue » avec celle des bacilles aviaires, tandis qu'à doses minimales « ces souches ne donnent presque jamais de lésions nodulaires et demeurent inoffensives ». D'après ces constatations, qui concordent avec les nôtres, s'il est possible de différencier ces bacilles des bacilles aviaires virulents, l'expérimentation sur

les animaux ne permet pas de les distinguer des bacilles aviaires peu virulents ou avirulents. Nous pensons, en effet, qu'il n'y a aucune raison pour attribuer à leur virulence particulière pour la poule et le lapin une valeur différentielle qui permettrait de les distinguer des souches aviaires avirulentes ou peu virulentes. La seule méthode sur laquelle on puisse se fonder pour différencier ces diverses souches d'une façon sûre est la méthode sérologique.



FIG. 7. — Souche du type IV.
Ensemencement d'une suspension diluée sur le milieu de Löwenstein.

Quant au quatrième type aviaire, nos expériences se basent uniquement sur l'étude de deux souches. L'une a été isolée par P. Armand-Delille [14] du sang d'un enfant tuberculeux, l'autre par A. Saenz des organes d'un cobaye inoculé avec le sang d'une femme tuberculeuse. Les colonies de ces deux souches apparaissent dans les mêmes délais que celles des bacilles aviaires typiques ; elles montrent, comme celles-ci, des colonies d'un aspect assez uniformément hémisphérique

sans le polymorphisme marqué et l'abondance de colonies géantes qu'on rencontre pour les souches du type III (figures 6 et 7). Les réserves que nous avons faites pour les autres types à propos de la constance et la valeur diagnostique des caractères morphologiques s'appliquent aussi à ce quatrième type. La souche isolée par P. Armand-Delille, inoculée à la dose de 1 milligramme aux cobayes les a sensibilisés légèrement à la tuberculine. Sacrifiés après cinq mois, ces animaux ont été trouvés porteurs d'un abcès caséux à l'endroit de l'inoculation. Le pus de cet abcès contenait des bacilles acido-résistants. Les organes étaient indemnes de lésions. Les poules et les lapins inoculés avec 1 milligramme et 0 milligr. 1 par voie veineuse et sacrifiés après trois et cinq mois, ne présentaient pas de lésions macroscopiques. Les organes nous ont redonné des cultures identiques à celles que nous avons inoculées. La souche isolée par A. Saenz se comporte d'une façon analogue d'après les indications que cet auteur a bien voulu nous confier.

ETUDE DES CARACTÈRES COMMUNS AUX QUATRE TYPES
ET DE LEURS CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS AVEC LES SAPROPHYTES
ACIDO-RÉSISTANTS.

Nous avons montré la parenté très grande qui existe entre les souches de ces 4 types. Rappelons d'abord les caractères communs qui les différencient des saprophytes acido-résistants. Contrairement à ceux-ci, les souches décrites se développent assez lentement sur les milieux de culture, et seuls les différents milieux utilisés pour la culture des bacilles tuberculeux des mammifères permettent leur développement appréciable. Il est vrai que certaines souches se développent aussi, bien que médiocrement, sur les milieux d'une composition assez simple (gélose glycinée ou non, gélose Sabouraud), mais l'étude de l'utilisation des matières carbonées par ces souches, d'après la méthode de H. Braun [19], montre qu'elles ont les mêmes exigences que les bacilles tuberculeux des animaux à sang chaud. Sur le milieu synthétique indiqué par H. Braun (Chlorure d'ammonium, 0 gr. 5 ; sulfate de sodium, 0 gr. 5 ; sulfate de magnésium, 0 gr. 003 ; KH_2PO_4 ,

0 gr. 03 ; K^2HPO^4 , 0 gr. 13 ; source de carbone, 0 gr. 5 ; eau bidist., ad. 100 cent. cubes), contenant comme seule source d'azote un sel ammoniacal, leur développement exige, comme pour les bacilles tuberculeux, la présence de glycérine comme source de carbone, tandis que les sels des acides lactique, succinique et butyrique et la mannite ne sont pas utilisés [7]. La comparaison de la faculté d'assimilation de ces souches vis-à-vis de la glycérine et de la mannite, proposée comme moyen de différentiation des bacilles tuberculeux et des bacilles paratuberculeux par H. Braun [20] et P. Hauduroy [21], effectuée sur le milieu de H. Braun, nous a donné des résultats particulièrement nets. Les souches des 4 types aviaires se développent uniquement en présence de glycérine, tandis que les saprophytes acido-résistants donnent une culture tout aussi abondante en présence de mannite qu'en présence de glycérine.

Comme les bacilles aviaires typiques, les bacilles des 4 types se développent très lentement à 20°, et mieux à des températures plus élevées, jusqu'à 45°, mais à 50°, leur développement est arrêté. Inoculées à une dose de 1 à 10 milligrammes par voie sous-cutanée au cobaye, elles sensibilisent cet animal à la tuberculine et elles produisent, dans les cultures liquides, des tuberculines qui se montrent actives par épreuve intradermique chez le cobaye jusqu'à la dilution au 1/100.

Un caractère qui permet de distinguer de façon particulièrement nette les bacilles du groupe aviaire des saprophytes acido-résistants, est leur virulence par inoculation sous-occipitale d'après les recherches de A. Boquet et R. Broca. Ces auteurs ont montré que des souches des types I, II et III, même dénuées de pouvoir pathogène, quand on les inocule par toutes les autres voies, tuent le lapin par voie sous-occipitale à la dose de 0 milligr. 01 en quelques semaines avec des symptômes paralytiques. Les saprophytes acido-résistants, comme le bacille de la fléole et les bacilles des animaux à sang froid (B. du serpent, de la tortue), inoculés par la même voie à doses élevées, se montrent par contre entièrement inoffensifs. Il est indiqué de mentionner encore la persistance parfois très longue des bacilles des 4 types dans l'organisme

des animaux infectés, ainsi qu'il ressort pour le bacille aviaire des recherches de A. Boquet, A. Saenz et L. Costil [23] et leur résistance au traitement par l'acide sulfurique qu'ils partagent avec les bacilles humains et bovins (W. Schaefer [7], A. Saenz [13]). Les souches de ces types possèdent en outre, un certain pouvoir vaccinant contre une infection tuberculeuse virulente, ainsi que Mac Fadyean [24] l'a montré pour les souches aviaires typiques, A. Saenz et ses collaborateurs [14], pour celles du type III, et P. Armand-Delille et M^{lle} Bloch [19] pour une souche du type IV.

Toutes ces propriétés communes différencient les souches décrites des saprophytes acido-résistants et les rapprochent plutôt des bacilles des animaux à sang chaud. Mais a-t-on le droit d'affirmer que toutes ces souches appartiennent au même groupe que les bacilles de la tuberculose aviaire ? Il paraît, au premier abord, surprenant de vouloir réunir dans le même groupe des bacilles hautement virulents pour les oiseaux, et d'autres, comme les bacilles des types III et IV qui n'ont jamais été rencontrés dans les infections spontanées des oiseaux et qui, en outre, sont très peu virulents pour ces animaux. Mais nous avons vu que la virulence n'est pas un caractère suffisamment constant pour le considérer comme d'importance spécifique, étant donné que chaque espèce pathogène renferme aussi des souches avirulentes (6).

En réalité, il n'existe, en dehors du pouvoir antigène, aucun caractère véritablement distinctif entre ces 4 types de bacilles acido-résistants. C'est pourquoi nous pensons que, conformément aux principes de classification bactériologique, on est en droit de les considérer comme appartenant à un groupe unique qu'on pourrait appeler, d'après ses représentants les plus importants, le groupe aviaire des bacilles acido-résistants.

(6) Les essais entrepris pour différencier les bacilles du troisième groupe des bacilles tuberculeux aviaires vrais, par la courbe du pH sur les milieux liquides, n'ont pas donné de résultats satisfaisants (R. K. Goyal [25] et A. Saenz [13]).

ÉPIDÉMIOLOGIE ET RÉPARTITION DES TYPES
DANS LES INFECTIONS ANIMALES.

Au point de vue immunologique et épidémiologique, la distinction de types différents parmi les bacilles du groupe aviaire pose de nouveaux problèmes. Il ressort de nos expériences que l'existence d'antigènes fixateurs spécifiques des bacilles aviaires est tout à fait indépendante du pouvoir pathogène de ces germes. Ce sont donc d'autres facteurs qui conditionnent la virulence. Il est possible, par contre, que ces antigènes spécifiques jouent un rôle dans le processus d'immunisation active contre ces infections. Des expériences d'immunisation avec les différents types aviaires et des épreuves avec des bacilles de types homologues ou hétérologues pourraient éclaircir cette question qui ne manquerait pas d'intérêt pratique pour la vaccination de certains élevages de poules contre la tuberculose aviaire.

Au point de vue épidémiologique, nos recherches ont montré que la tuberculose aviaire est due, sinon exclusivement, du moins dans la grande majorité des cas, aux types I et II, et que la fréquence de ces deux types chez les oiseaux est sensiblement la même (tableau VIII). Il serait

VIII. — Distribution des différents types, parmi les souches
du groupe aviaire, isolées de cobayes et d'oiseaux.

	NOMBRE ABSOLU	POURCENTAGE
<i>Cobayes :</i>		
Type I	46	27,4
Type II	48	30,5
Type III	24	40,5
Type IV	1	1,8
<i>Oiseaux :</i>		
Type I	17	50,0
Type II	17	50,0

intéressant de savoir si des recherches poursuivies dans d'autres régions que la région parisienne montrent une répartition analogue des types. En outre, nous avons eu l'occasion d'examiner 59 souches aviaires qui ont été isolées pour le plus grand nombre de cobayes d'expériences. De

même que pour les souches provenant d'oiseaux tuberculeux, nous avons trouvé parmi les souches isolées du cobaye des nombres équivalents de souches des types I et II (16 et 18). Mais nous avons rencontré encore un nombre considérable de souches du type III et une seule souche du type IV. L'origine de ces infections n'est pas encore élucidée. D'après A. Saenz et L. Costil [43], il s'agit soit d'infections spontanées par la nourriture, soit d'infections accidentelles par suite de piqûres répétées faites au cours des expériences. Des infections aérogènes de cobayes se trouvant en contact soit avec des oiseaux, soit avec des cobayes expérimentalement infectés, ont été signalées par A. S. Griffith [26] et par R. Helm [27]. L'infection des cobayes, à la suite de piqûres répétées, avait été signalée également par C. Ninni et J. Bretey [28]. A propos de ces souches isolées de cobayes, nous reprendrons à notre compte une remarque que A. Boquet [29] a faite au sujet d'un bacille aviaire non virulent pour le lapin et la poule isolé chez deux cobayes auxquels cet auteur avait inoculé le liquide céphalo-rachidien d'un enfant ayant présenté des troubles nerveux passagers : « Sans doute les recherches effectuées par A. Saenz et L. Costil, par M^{me} Gaiginski et par nous-même fournissent la preuve que des cobayes, en apparence sains, hébergent parfois des bacilles acido-résistants dont certains sont capables d'engendrer une allergie durable ; toutefois, la proportion en est minime. D'autre part, nous sommes trop averti des causes d'erreurs qui peuvent se glisser dans les recherches les mieux conduites, depuis le prélèvement jusqu'à l'inoculation des produits suspects, pour conclure de cette observation au rôle étiologique de notre microbe. »

Il est donc, pour le moment, impossible de se prononcer sur l'origine des souches aviaires parasitant le cobaye et sur la fréquence réelle des 4 types isolés chez cet animal.

APPLICATION PRATIQUE DU SÉRO-DIAGNOSTIC DES BACILLES DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE.

Il ressort des recherches précédentes que les réactions sérologiques des souches aviaires peuvent être utilisées pour leur

identification. Voici encore quelques précisions pour l'application pratique de la réaction de fixation du complément comme test d'identification des souches et telles qu'elles découlent des expériences citées plus haut. L'émulsion bacillaire, dont le type est à déterminer, doit être examinée en présence des antisérums des types aviaires absorbés ou non suivant la spécificité que ce sérum possède. La souche examinée appartient au type dont elle fixe l'antisérum. Il sera utile d'étudier en même temps 4 souches connues appartenant à chacun des 4 types pour s'assurer de la spécificité de la réaction. Etant donné que les souches isolées de cas de tuberculose aviaire spontanée, semblent appartenir exclusivement au type I ou II, il suffira d'examiner ces souches en présence des antisérums de ces deux premiers types pour établir le diagnostic. La technique peut même être simplifiée encore, s'il s'agit tout simplement de l'identification d'un bacille de tuberculose aviaire, sans se préoccuper de son type particulier. Dans ces cas, on peut, en effet, se servir d'un seul antisérum « bivalent », préparé avec un mélange des deux premiers types aviaires. Un tel antisérum, débarrassé de ses anticorps de groupe, réagira indistinctement et spécifiquement, comme l'expérience nous l'a montré avec toutes les souches de tuberculose aviaire spontanée.

La séro-identification des bacilles aviaires présente de grands avantages par rapport à l'identification par l'inoculation à des animaux réceptifs : 1° par la rapidité avec laquelle les résultats sont obtenus ; et, 2° par sa sûreté, puisqu'elle est à l'abri des causes d'erreur qui, au cours de l'expérimentation sur les animaux, peuvent provenir d'infections spontanées des oiseaux par des bacilles aviaires et dont le dépistage est difficile en raison de la faible sensibilité de ces animaux vis-à-vis de la tuberculine. Elle permet en outre l'identification des souches aviaires avirulentes ou peu virulentes pour lesquelles l'expérience sur les animaux échoue complètement [6].

L'examen sérologique trouve encore une application pour le contrôle de la pureté des souches aviaires [11]. Nous avons trouvé, en effet, quelques souches aviaires qui réagissaient à la fois avec les antisérums des deux types aviaires. L'antisé-

rum que nous avons préparé avec une de ces souches contenait également des anticorps réagissant avec les deux types, et nous avons pu montrer, par des expériences d'absorption séparée de chacun de ces anticorps, qu'il s'agissait véritablement de deux anticorps pour deux types aviaires différents. La sérologie permet donc de mettre en évidence l'existence de contamination d'une souche aviaire par une autre souche aviaire appartenant à un type différent.

CONCLUSIONS.

1° La réaction de fixation du complément par des émulsions bacillaires et des antisérums privés de leurs anticorps de groupe par absorption, permet l'identification sérologique des bacilles tuberculeux aviaires. Parmi 94 souches isolées de cas de tuberculose spontanée chez des oiseaux ou chez des cobayes non tuberculeux, quatre types sérologiques ont pu être distingués.

2° Ces quatre types ont de nombreux caractères communs : aspect lisse sur les milieux de culture, développement entre 20° et 43°; exigences nutritives (pouvoir assimilant pour les sources de carbone) comparables à celles des bacilles tuberculeux des animaux à sang chaud, sensibilisation du cobaye à la tuberculine, et production d'une tuberculine assez active, virulence pour le lapin en inoculation sous-occipitale ; longue persistance dans l'organisme des animaux infectés et survie après un traitement par l'acide sulfurique à 5 p. 100 comme les bacilles tuberculeux.

3° Les types I et II ont les caractères classiques des bacilles de la tuberculose aviaire; ils renferment les bacilles tuberculeux aviaires proprement dits, virulents pour la poule et le lapin, et des souches plus ou moins avirulentes.

4° Le type III n'a été trouvé jusqu'à présent que comme parasite accidentel du cobaye. Il est peu ou pas virulent pour la poule et le lapin, et il se distingue des deux premiers types par le polymorphisme, en général, plus accentué de ses colonies sur le milieu de Löwenstein. Cet aspect se rencontre cependant parfois aussi pour quelques souches des autres types.

5° Le type IV n'a été rencontré que deux fois. Il se rap-

proche par ses caractères cultureux et biologiques des bacilles avirulents des autres types.

6° Ces quatre types ne se différencient donc d'une façon sûre, que par leurs caractères sérologiques, et ils forment un groupe biologique qu'on pourrait appeler, d'après ses représentants les plus importants, « le groupe aviaire » des bacilles acido-résistants.

7° Les types I et II sont les seuls agents de la tuberculose spontanée des oiseaux, et ils sont rencontrés avec une fréquence sensiblement égale. Les quatre types ont été trouvés comme parasites accidentels chez des cobayes d'expériences.

8° La détermination sérologique des types facilite grandement l'identification des souches aviaires virulentes et avirulentes et permet également un contrôle aisé de la pureté de ces germes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WILSON (G. S.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **28**, 1925, p. 69.
- [2] GRIFFITH (A. St.). *Tubercle*, juin 1925, p. 417.
- [3] FURTH (J.). *Journ. of Immunol.*, **12**, 1926, p. 273.
- [4] SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 1935, p. 643 et 645.
- [5] BATTAGLINI (U.). *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 1935, p. 305.
- [6] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 59 et 169.
- [7] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 961 et 1086.
- [8] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 590.
- [9] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 1185.
- [10] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 815.
- [11] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 1290.
- [12] SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 1286.
- [13] SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *Ces Annales*, **57**, 1936, p. 254.
- [14] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 300.
- [15] VALTIS (J.) et VAN DEINSE (F.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 933.
- [16] BABLET (J.), VALTIS (J.) et VAN DEINSE (F.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 936.
- [17] ARMAND-DELILLE (P.) et GAVOIS (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **111**, 1932, p. 580 ; et **112**, 1933, p. 1150.
- [18] ARMAND-DELILLE (P.) et M^{lle} BLOCH (Fr.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 384.
- [19] BRAUN (H.). *Handb. d. biolog. Arbeitsmeth.*, Abt. XII, **2**, 1930.
- [20] BRAUN (H.) et KONDO (S.). *Klin. Wochenschr.*, 1924, p. 10.
- [21] HAUDUROY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **110**, 1930, p. 559.
- [22] BOQUET (A.) et BROCA (R.). *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 8.

- [23] BOQUET (A.), SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 517.
- [24] MAC FADYEAN, SHAETHER, EDWARDS et MINETT. *Journ. of comp. Path. a. Tbc.*, **26**, 1913, p. 327.
- [25] GOYAL (R. K.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 390 ; et *Tubercle*, novembre 1936, p. 66.
- [26] GRIFFITH (A. St.). *Journ. of path. a. bact.*, **33**, 1930, p. 153.
- [27] HELM (R.). *Zeitschr. f. Inf. d. Haustiere*, **94**, 1936, p. 79.
- [28] NINNI (C.) et BRETEY (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 390.
- [29] BOQUET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **117**, 1934, p. 662.

ÉTUDES SUR LA DISSOCIATION *IN VIVO* DES *BRUCELLA* PAR INOCULATION AUX ANIMAUX TUBERCULEUX (*)

Par W. SARNOWIEC.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de Recherches
sur la tuberculose.*)

Dès la fin du xix^e siècle, on avait pensé qu'une variation naturelle, désignée aujourd'hui sous le nom de « dissociation » se produisait chez certaines espèces bactériennes. Tout d'abord, on trouve les affirmations de Nägeli (1882) [15] d'après lesquelles les « cocci se transforment en bâtonnets, et les bâtonnets en spirilles » ; puis celles des frères Buchner (1883) [4] qui affirment que *B. anthracis* n'est qu'une autre forme de *B. subtilis*, etc.

Mais le postulat de Koch pour qui la fixité et l'invariabilité des espèces bactériennes étaient un dogme, s'opposait à ces conceptions.

Vers la même époque, le botaniste Cohn insistait, avec la même intransigeance, sur la conservation des types bactériens et avait construit tout un système des espèces basé entièrement sur leurs caractères morphologiques et biochimiques.

Mais, pendant le rapide développement de la science bactériologique, des publications relataient, de temps à autre, d'étonnantes variations bactériennes. Ces travaux, notamment, des auteurs comme Lehmann et Neumann, Kossel et Kolle; Kruse [12] avec le *Vibrio* cholérique (souche VI), Gruber et Fivtch [8] sur *Vibrio* de Finkler-Prior, etc..., restaient cependant sans écho : on attribuait les faits observés à une hypothétique contamination et, si parfois on les admettait, on ne leur reconnaissait aucune importance pratique.

(*) Notre étude est limitée à l'action du passage de *Brucella abortus* (type bovis) chez des animaux ayant reçu une injection de bacilles tuberculeux virulents ou tués par la chaleur, ou de BCG.

Le dogme de l'absolue constance des types microbiens restait absolument intangible.

Ce n'est qu'en 1906 et 1907, que Neisser [16] et Massini [14] réaffirmèrent avec éclat leurs observations sur les « variations » du *B. coli*.

Les recherches de Kowalenko (1910) [13], provoquées par les critiques de Kolle, en furent une confirmation: Kowalenko eut la précaution de prendre, comme point de départ, une unique bactérie.

Ce résultat, remarquable pour son temps, permit, par analogie, d'introduire dans l'étude des variations microbiennes le terme « mutation » utilisé par Hugo de Vries en botanique.

Les études de Neisser et Massini servirent de base et de stimulant à un très grand nombre de recherches effectuées entre 1907 et 1914, spécialement par l'école anglaise où l'on retrouve un nombre considérable d'allusions à des cas de « mutation microbienne ». Plusieurs de ces observations, principalement celles de source allemande, furent rassemblées par Eisenberg (1914) [7] dans une monographie où il s'efforça d'analyser les divers types de variations et de les classer suivant leur importance : modifications, fluctuations, formes permanentes (ces dernières désignées sous le terme de *mutations*).

Puis, en 1918, parut l'ouvrage classique de Baerthlein [2] portant sur 14 espèces bactériennes, au point de vue de leurs variations, de leur morphologie, de leur chromogénèse, de leurs réactions biochimiques et sérologiques et de leur virulence.

Arkwright [4], dans son travail sur les variations des colonies du groupe typhique-coli-dysentérique montre que, parmi elles, il a observé et distingué deux types : R (rough) et S (smooth). Il décrit leur morphologie, leurs caractères de culture, leurs réactions biochimiques et sérologiques. Des études similaires ont été faites par de Kruif (1921) sur les variétés de formes de colonies et les propriétés biologiques de *B. leptisepticum*, pour lequel il a trouvé que la *virulence* est la caractéristique certaine de la *variante S* et l'*absence de virulence* celle de la *variante R*. En outre, il a remarqué que la variante S possède un plus grand pouvoir antigène.

Le travail de Weil et Félix (1917) [26], sur le *Proteus X 19*,

confirme les constatations ci-dessus. Les auteurs ont décrit les types des colonies O et H douées de propriétés antigènes différentes : les colonies O donnent un sérum qui produit un type d'agglutination fine et les colonies H un type d'agglutination grossière. En outre, ils ont signalé également la thermolabilité de l'antigène H et la thermostabilité de l'antigène O.

Ces constatations se sont trouvées rapidement confirmées dans leurs grandes lignes pour certaines autres espèces microbiennes, telles que le streptocoque par Mary Cowan (1922-1924) [3], les pneumocoques par Griffith (1923) [9] et Reiman (1923) [18], le *B. enteritidis* « Aertrycke » par Topley et Ayrton (1924) [25] et par Bruce et White (1925) [5] pour le groupe *Salmonella*, par Julianelle (1926) [44] pour le *B.* de Friedländer, par Hadley (1927) [40] pour le groupe *Brucella* et *B. pyocyaneus*, et par Soule (1928-1932) [23] pour *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. megatherium*, *B. mesentericus* et *B. cereus*.

Quant aux premiers travaux se rapportant aux variations de *Br. melitensis*, ils sont présentés dans l'œuvre classique de Burnet (1925) [6]. Cet auteur, examinant de nombreuses souches de ce bacille, remarqua qu'en présence d'un sérum donné, les unes agglutinaient à des taux élevés de dilution (1/2.000 à 1/1.000), les autres à des taux moindres (1/100 à 1/200), d'autres presque pas ; de plus, il y aurait des souches intermédiaires.

Il distingua cependant 2 catégories I et II. Si nous immunisons des lapins, respectivement avec les antigènes I et II, le sérum I agglutine très bien la souche I, faiblement la souche II ; le sérum obtenu avec l'antigène II agglutine très bien cet antigène, mais aucunement l'antigène I.

Burnet constata également qu'il était difficile, avec l'antigène II, de conférer un pouvoir agglutinant au sérum du lapin et qu'il était toujours inférieur, au point de vue de l'agglutination, à l'antigène I.

Continuant ses travaux sur *Br. abortus*, Burnet obtint confirmation des résultats qu'il avait déjà eus avec *Br. melitensis*. Cependant, c'est Ross [17] qui, à ce sujet, précisa la question : ses recherches portent, en particulier, sur 3 *melitensis*, 3 *abortus bovis* et 1 *para-melitensis*.

Par des expériences d'absorption, il confirme la différence sérologique entre *Br. melitensis* et *Br. abortus* que la seule agglutination ne peut montrer. Cette dernière ne permet de différencier que, d'une part *B. melitensis*, d'autre part *Br. para-melitensis* et *Br. para-abortus*.

Enfin, étudiant 8 sérums provenant d'humains atteints de fièvre ondulante, il en trouve 6 correspondant sérologiquement à *Br. abortus* et 2 à *Br. para-abortus bovis*.

Ross estime que le groupe *melitensis* et *abortus* répond au type S, et le groupe *para-melitensis* et *para-abortus* au type R.

Le tout récent travail de Szymanowski [24] confirme les travaux cités ci-dessus en ce qui regarde la transformation du B. de Bang de la forme S à la forme R.

Enfin, des recherches entreprises par nous-même en 1931-1933 [20] nous avaient déjà permis de formuler les conclusions suivantes :

1° Les souches, récemment isolées, de *Br. bovis* ne sont pas toujours agglutinées facilement par les sérums spécifiques : privées, à ce moment, de pouvoir antigène, elles peuvent l'acquérir dans les générations suivantes par simple repiquage.

2° Les pouvoirs agglutinant et antigène des souches sont étroitement liés entre eux.

3° Les souches de culture récente ne sont pas capables d'accroître rapidement leur virulence par vieillissement ; les microbes paraissent stables sous ce rapport.

En nous basant sur les expériences citées plus haut, nous avons essayé d'étudier les possibilités de dissociation du B. de Bang (*Brucella abortus bovis*) *in vivo*.

Lorsque nos précédentes recherches [21] (obtention des pouvoirs agglutinant et précipitant) nous eurent montré l'action favorable de la tuberculose sur le développement de *Br. abortus bovis*, il nous parut intéressant de prélever et d'isoler des *Brucella* de ce type sur des animaux ainsi préparés, et de voir s'il en résultait des modifications de leurs caractères culturels et de leur pouvoir pathogène.

C'est pourquoi nous avons fait cette étude sur des animaux préalablement infectés par le bacille de Koch.

I. — Données expérimentales.

Nous avons utilisé pour nos essais des souches de *B. abortus* du Laboratoire national de Recherches d'Alfort. Nous nous sommes servi de 4 souches ; parmi elles, 2 étaient fortement agglutinables (1/1.000), une l'était peu (1/100-1/300), la dernière ne l'était qu'à un taux insignifiant. Elles étaient cultivées sur gélose ordinaire, laissées vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, puis injectées, à la dose de 1 cent. cube, dans le péritoine d'animaux tuberculeux.

Les animaux que nous avons soumis aux essais étaient à des stades divers de la tuberculose. L'infection avait été obtenue par inoculation sous-cutanée de bacilles du type humain ou du type bovin, vivants, à des doses allant de 1/1.000 à 1/10.000 de milligramme.

Les sujets étaient sacrifiés successivement du premier au quinzième jour après l'injection de *Br. abortus*. Les résultats de cette série d'essais sont condensés dans le tableau V.

Les prélèvements de foie, de sang, de rate et de liquide péritonéal étaientensemencés sur gélose et bouillon ordinaires, puis examinés après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. Lorsque aucune colonie ne s'était formée, le prélèvement était remis à l'étuve pour une nouvelle période de vingt-quatre heures.

Quand le résultat était positif, l'examen était fait au point de vue cultural, sérologique, physique et au point de vue de la virulence.

Nous désignons par la lettre S les variétés de colonies de *Br. abortus* qui sont de consistance homogène, facilement émulsionnables dans l'eau physiologique et dans d'autres liquides, *non thermo-agglutinables*, et par la lettre R la variété granuleuse « rugueuse », très difficilement émulsionnable et *thermo-agglutinable*.

Des 4 souches dont nous disposions, 2 seulement, D et Neuville, se sont dissociées et se sont révélées identiques ; c'est pourquoi nous ne décrivons que la souche Neuville.

A titre de contrôle, nous avons répété nos essais sur des

animaux sains et sur des animaux préparés avec du BCG ou avec des bacilles tuberculeux morts (dose : 1 milligramme). Nous avons toujours opéré suivant la même technique et le même mode opératoire que pour l'étude des cobayes tuberculeux.

Nous n'avons pas eu l'occasion de faire de remarque particulière sur ces animaux. C'est pourquoi nous nous bornons à résumer les faits constatés dans le même tableau (n° V), ce qui permettra une très facile comparaison avec ceux relatifs aux essais sur des animaux tuberculeux (1).

Nota. — La souche de *Brucella bovis*, inoculée à un cobaye tuberculeux, voit sa virulence accrue (2). Nous l'avons fait alors passer successivement par plusieurs organismes tuberculeux afin de nous rendre compte si sa virulence augmente encore : l'expérience a été négative à ce point de vue.

II. — Souche Neuville.

Brucella abortus hovis isolée d'un bovin.

La souche Neuville (fig. 4), qui nous a servi dans nos expériences, était de type S provenant d'un bovin (enzootie d'avortement épizootique). Elle était cultivée au laboratoire depuis plusieurs années.

CARACTÈRES PRINCIPAUX. — Les colonies sont régulièrement circulaires, de 0 mm. 5 environ de diamètre, humides et claires ; elles ont une fluorescence bleu-verdâtre-jaune en lumière transmise. Si l'on ensemence sur gélose, les colonies se développent très rapidement avec une telle abondance qu'il est très difficile de les distinguer les unes des autres.

Les colonies se développent aussi bien en milieu alcalin (pH = 8) qu'en milieu acide (pH = 6.5).

(1) Ces cas de dissociation, que nous avons obtenus, semblent avoir été déterminés par le hasard ; il ne nous est pas possible de fixer les divers points d'une technique qui permettrait de les obtenir à coup sûr. Toutefois, il semble qu'ils se produisent plus aisément lorsque le Bac. de Bang est présent depuis un temps suffisant dans l'organisme tuberculeux.

(2) Voir ci-après les réactions données par la souche S.

La souche s'émulsionne très facilement dans l'eau physiologique et dans d'autres liquides et demeure longtemps sans sédimentation : l'émulsion reste uniformément trouble.

Des frottis faits avec l'émulsion montrent, au microscope, des groupes de tout petits bâtonnets ovoïdes répartis en amas.

Les bacilles isolés mesurent $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 5$ de longueur et

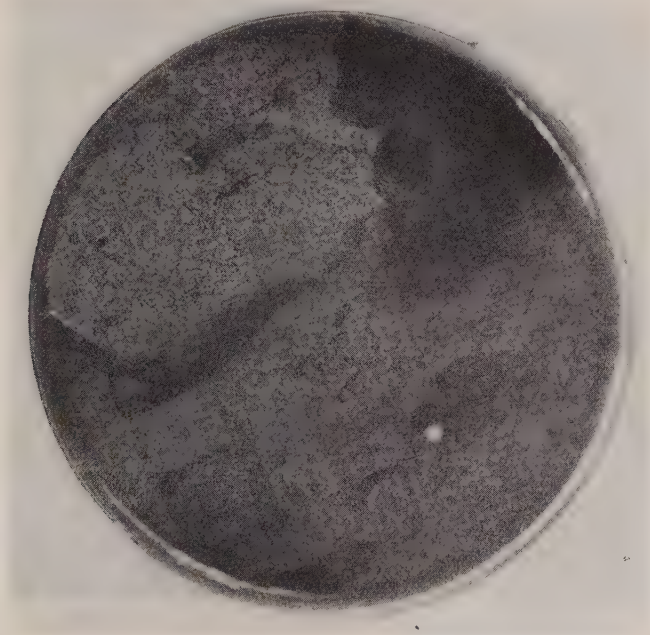


FIG. 4. — Culture S sur gélose.

$0\ \mu\ 5$ de largeur. Ils sont immobiles et polymorphes et offrent des caractères de coloration classiques pour l'espèce *Brucella*. Ils sont Gram-négatifs. Les colonies sur gélose sont lisses (humides), homogènes, avec une surface presque plate ; la culture ressemble de façon frappante à la culture du type S.

Sur pomme de terre glycinée, la souche Neuville donne une culture homogène, luisante, crémeuse (fig. 2).

Sur bouillon glyciné ou en bouillon ordinaire, elle présente l'évolution suivante (fig. 3) :

Tout d'abord, un développement initial diffus dans tout le milieu entraînant un trouble persistant environ une semaine. Ensuite, un abondant dépôt s'accumule dans le ballon tandis qu'on note un léger éclaircissement du bouillon.

Si nous partons du bouillon glycérimé, dont le pH a été ajusté à 7,4, ce milieu devient acide ($\text{pH} = 6,6$) après environ

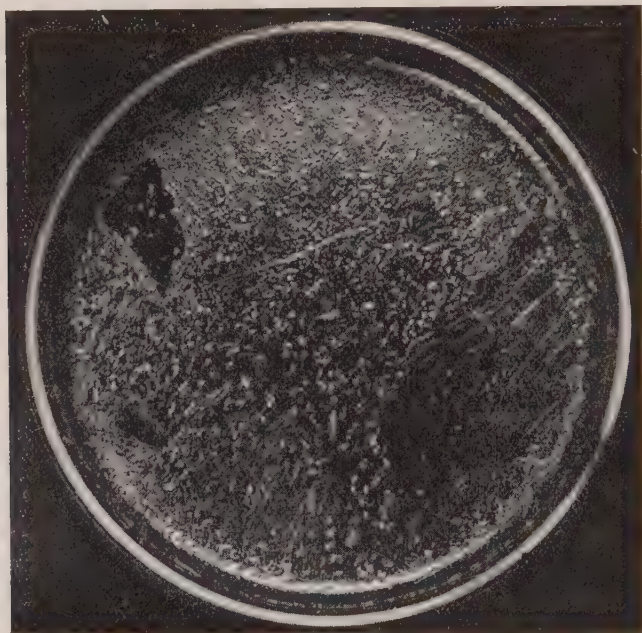


FIG. 2. — Colonies R jeunes sur gélouse.

deux semaines de culture. Plus tard, on constate une réaction alcaline ($\text{pH} = 8,3$).

Sur bouillon ordinaire, l'action acidifiante est peu marquée.

Les essais d'action bactéricide de la chaleur (3) sur ces *Bru*-

(3) La méthode employée pour les essais sur l'action bactéricide de la chaleur consiste à suspendre environ 4 milliards de bacilles dans 1 cent. cube d'eau physiologique et à placer le mélange dans une pipette Pasteur (remplie à moitié) scellée à la flamme. Les pipettes sont complètement immergées dans un bain-marie fermé à température constante. Immédiatement après leur immersion, les pipettes sont ouvertes aseptiquement et 1 cent. cube environ du liquide est aspiré

cella ont montré qu'elles résistent pendant quinze minutes à 56°, et sont détruites après une demi-heure à 56°. D'autre part, nous n'avons remarqué aucune réaction particulière avec le bouillon et la gélose sucrés (glucose, lactose, lévulose, saccharose) ou mannités (mannite « Endo »), ainsi que sur la gélose sucrée tournesolée (glucose, lactose, lévulose, saccharose) ou mannitée.

De même elles n'attaquent et ne fermentent pas les sucres. Toutefois, les ensemencements sur les géloses sucrées sont plus précoces et plus abondants par comparaison avec ce que l'on obtient sur gélose ordinaire.

La culture continue à la température du laboratoire (20 à 30°) aussi bien sur les milieux liquides que sur les milieux solides.

Pour conserver cette souche, on peut la réensemencer toutes les six semaines si on la conserve au laboratoire,

au moyen d'une pipette Pasteur et réparti dans des tubes contenant du bouillon et de la gélose.

Ces derniers sont laissés à l'étuve à 37° pendant quelques jours et réensemencés à nouveau dans les mêmes milieux. On constate alors, à la lecture, la présence ou l'absence de colonies.



FIG. 3. — Culture S sur pomme de terre (colonies jeunes).

et tous les deux ou trois mois si on la garde à la glacière.

VIRULENCE. — L'injection aux cobayes sains ne provoque aucune mortalité, même après deux à quatre mois. La virulence est notablement plus faible que celle de la souche S obtenue par passage sur cobayes tuberculeux.

Cependant, en sacrifiant un des sujets au bout d'un mois environ, nous avons pu prélever et cultiver une colonie de bacilles de Bang de même type S.

PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES. — *Agglutination* : Les propriétés antigènes étaient bien marquées. Une émulsion de culture souche Neuville S (un tube de culture 16/16 pour 5 cent. cubes de sérum physiologique) est inoculée, à deux reprises, à la dose de 1 cent. cube, à quatre jours d'intervalle, à un lapin par voie intraveineuse ou à un cobaye par voie intrapéritonéale. L'animal est saigné douze jours après la seconde inoculation. On dispose alors d'un sérum doué d'un très fort pouvoir agglutinant (1/1.000).

D'autre part, avec 10 échantillons de sérums provenant de bovins naturellement atteints, nous obtenons de très fortes réactions agglutinantes (1/1.000 à 1/3.000) suivant la valeur du sérum examiné.

Pour tous nos essais sérologiques (agglutination, absorption, déviation du complément), exposés dans le présent travail, nous avons employé, comme antigène, des cultures de quarante-huit heures de bacilles de Bang vivants, émulsionnés dans l'eau physiologique.

Le sérum examiné était chauffé à 56° pendant une demi-heure, puis réparti dans une série de tubes ($d = 5$; $e = 30$) : ces quantités correspondaient aux dilutions suivantes : 1/15, 1/30, 1/60, 1/100, 1/300, 1/600, 1/1.000, 1/3.000, 1/6.000, 1/10.000. Les résultats ont été lus après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve (voir tableau II).

Absorption : L'essai d'absorption était effectué de la façon suivante :

Le sérum était dilué, avec une solution saline, au taux de 1/64 ; ainsi, un sérum ayant un taux d'agglutination à 1/1.280 était dilué au 1/20.

Les *Brucella* étaient cultivées deux à trois jours sur gélose, lavées avec une solution à 0,25 p. 100 d'eau salée et l'émulsion utilisée sans chauffage ni addition d'antiseptique. Elle était ensuite titrée et amenée à une teneur correspondant à 3 milliards de germes par centimètre cube (tandis que les suspensions d'agglutination n'avaient qu'une teneur de 1 milliard de germes par centimètre cube). Un égal volume de sérum et de suspension était mis en contact pendant plusieurs heures à 37° et laissé ensuite au frigorigène pendant vingt-quatre heures. On procédait alors à la centrifugation et le pouvoir agglutinant du liquide surnageant était essayé à une série de dilutions contre les souches homologues (Neuville, type S) et hétérologues R.

Les résultats furent remarquablement nets. Il s'est trouvé que dans certains cas l'absorption n'était pas totale et que le sérum conservait encore la faculté d'agir sur une souche homologue (type S), mais à un taux très bas (1/13, 1/60).

Précipitation : Pour cette opération, nous avons utilisé le filtrat sur bougie L2 d'une cultureensemencée en bouillon glyciné ayant séjourné à l'étuve pendant un mois. Les sérums étudiés donnèrent des réactions positives : à la zone de contact des deux liquides (sérum et filtrat) se forme un anneau assez épais qui disparaît au bout de quelques minutes.

Déviatiou du complément : Pour effectuer cette réaction, nous avons utilisé la méthode suivante :

Les sérums examinés étaient chauffés à 56° pendant une demi-heure, puis versés dans une série de tubes aux dilutions ci-après : 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1.280 et 1/2.560 obtenus dans un volume de 0 c. c. 25. On ajoute dans chaque tube, de même capacité que celui que l'on emploie pour l'épreuve d'agglutination, 0 c. c. 25 d'antigène (taux de 1 million de germes par centimètre cube), puis 0 c. c. 25 d'alexine au 1/15. Après un séjour d'une heure à l'étuve à 37°, on ajoute 0 c. c. 5 d'un mélange, à parties égales, de globules rouges de mouton à 5 p. 100 et de sérum hémolytique (trois à cinq doses minima lysantes).

Le résultat de l'hémolyse obtenue après addition du système hémolytique est indiqué dans le tableau IV.

III. — Caractères biologiques de *Br. abortus bovis* souche Neuville dissociée *in vivo* en S et R.

CARACTÈRES PRINCIPAUX. — 1. *Souche S.* Ces colonies (fig. 1), lorsqu'elles sont isolées, sont régulièrement circulaires, de 0 mm. 5 de diamètre, humides et claires; elles ont

une fluorescence bleu-verdâtre en lumière transmise. Confluentes, elles deviennent telles qu'il est impossible de les distinguer et forment un enduit transparent continu.

Les colonies se développent aussi bien en milieu alcalin (pH = 8) qu'en milieu acide (pH = 6,5).

Elles s'émulsionnent très facilement dans l'eau physiologique et dans d'autres liquides et demeurent longtemps sans sédimenter. L'émulsion reste uniformément trouble. Des frottis effectués montrent, au microscope, des groupes de bâtonnets ovoïdes immobiles répartis en tout petits amas. Les bacilles se colorent facilement avec les colorants ordinaires. Ils sont beaucoup plus sensibles aux matières colorantes que les précédents.

Les bacilles isolés mesurent $4\ \mu$ à $4\ \mu\ 5$ de longueur et $0\ \mu\ 3$ de largeur ; ils sont Gram-négatifs, polymorphes, immobiles ; les colonies sur gélose sont lisses, de couleur bleutée.

Sur pomme de terre, la culture est crémeuse, luisante et homogène avec une surface plate ressemblant tout à fait à celle de la variété type S. Les cultures de quelques jours rappellent les caractères du bacille de la morve (fig. 2).

Le développement, dans le bouillon glycérimé ou en bouillon ordinaire, présente l'évolution suivante (fig. 3) :

1° une multiplication initiale, diffuse dans tout le milieu, trouble persistant une semaine environ ;

2° un abondant dépôt suivi d'un léger éclaircissement du bouillon.

Le bouillon glycérimé, de pH 7,4, devient acide (pH 6,2) après environ deux semaines, puis il redevient alcalin au bout de six semaines (pH 8,2 à 8,4). Sur bouillon ordinaire, acidification peu marquée.

Les essais d'action bactéricide de la chaleur ont montré que ces *Brucella* ne résistent que pendant une demi-heure à 56°.

D'autre part, nous n'avons remarqué aucune réaction particulière avec le bouillon ou la gélose sucrée ou mannitée (glucose, lactose, levulose, saccharose) et « Endo », ainsi que sur la gélose sucrée tournesolée (glucose, lévulose, lactose, saccharose) ou mannitée.

Ces *Brucella* n'attaquent et ne fermentent donc pas les sucres. Toutefois, lesensemencements sur les géloses sucrées sont plus précoces et plus abondants, par comparaison avec ce que l'on obtient sur gélose ordinaire. Enfin, le développement des colonies est très rapide à la température du laboratoire (20 à 30°). Pour conserver le type S, on le réensemence toutes les six semaines si on le conserve au laboratoire, tous les trois mois si on le garde au frigorifique. Les chiffres ci-dessus indiquent les délais maxima pour les cultures faites sur gélose ordinaire. Ils peuvent être notablement plus longs sur gélose sucrée.

VIRULENCE. — Très forte vis-à-vis des cobayes neufs. Dans 3 cas sur 5 d'inoculation sous-cutanée, il y a eu formation, localement, de gros abcès dans lesquels nous avons isolé *Br. abortus* à l'état pur. Les sujets maigrissent peu à peu et succombent au bout d'un mois à une septicémie due au bacille de Bang.

Sur 5 autres sujets (tuberculeux depuis trois mois), 2 succombèrent au bout de vingt-quatre heures.

Propriétés sérologiques : Agglutination avec le sérum homologue, c'est-à-dire préparé avec le type S.

Les propriétés agglutinantes sont extrêmement fortes. La souche S, inoculée à un cobaye et à un lapin, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, donne un sérum très agglutinant (1/1.000 à 1/2.000). Avec l'antigène S donné, le sérum de bovins naturellement infectés (10 échantillons), agglutinait cette souche S très fortement (1/2.000 à 1/10.000, suivant le sérum considéré).

Le sérum de lapin ou de cobaye ainsi préparé, puis absorbé par les souches homologues, laisse un liquide surnageant qui continue à agglutiner légèrement (1/15).

Précipitation : Pour cette opération, nous avons utilisé l'antigène préparé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les sérums étudiés donnèrent des réactions parfaitement positives, c'est-à-dire qu'au point de contact du sérum avec l'antigène, se formait un assez large anneau persistant pendant une dizaine de minutes.

Déviatiou du complément : L'opération a été faite exacte-

ment de la même manière que celle décrite plus haut (voir tableau V).

IV. — Souche R.

Caractères principaux. — Les colonies (fig. 4) sur gélose sont *opaques*, de couleur bleu-clair, de surface brillante, *très granuleuses, cireuses et sèches* ; de forme irrégulière, elles se présentent en saillie sur le milieu avec un centre légèrement proéminent. Leur surface est rugueuse et elles sont crénelées à la périphérie. En un mot, elles appartiennent aux colonies du type R.

Ces *Brucella* restent polymorphes : leurs dimensions varient de $0\ \mu\ 5$ à $1\ \mu\ 5$ et $2\ \mu\ 5$ rappelant celles des cocci plus ou moins ovoïdes ou celles des bâtonnets.

Ensemencées sur agar-agar, elles se développent assez difficilement. Les colonies un peu âgées ayant séjourné quelques jours à l'étuve grandissent, pouvant atteindre un diamètre de 1 mm. 5 à 4 ou 5 millimètres. Elles tendent à donner naissance à des colonies secondaires (fig. 5). Leur culture, prolongée pendant plusieurs générations, montre la fixité de leurs caractères.

Elles s'émulsionnent *très difficilement* : on ne peut y arriver que grâce à une forte agitation avec des billes de verre et encore l'homogénéisation n'est-elle pas toujours parfaite et la sédimentation s'opère rapidement. D'autre part, l'émulsion est *thermo-agglutinable*.

Des frottis montrent une distribution granuleuse des bacilles qui adhèrent très mal sur la lame. Très *polymorphe* et immobile, la *Brucella* de type R est beaucoup moins facile à colorer avec les colorants habituels que celle de type S. Elle ne prend pas le Gram. La différence morphologique entre la variété S et la variété R est faible ; cependant, on peut les distinguer par le fait que la variété R se rassemble toujours en amas, et que la bactérie elle-même est tantôt plus petite, tantôt plus grande et de coloration plus fine. De nombreux bacilles agglutinés se trouvent aussi bien dans les cultures jeunes que dans les cultures âgées.

La culture en bouillon glycérimé ou en bouillon ordinaire (pH 7,4) évolue ainsi :

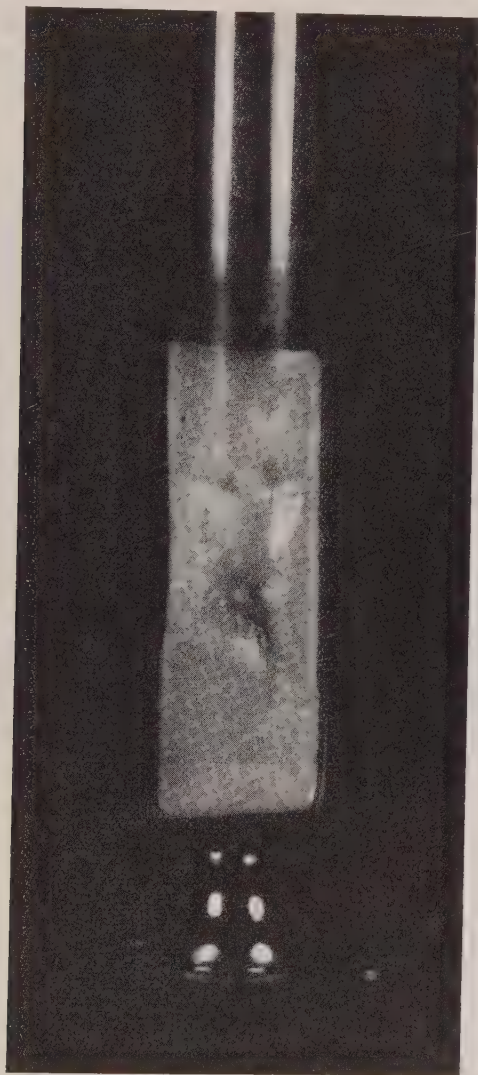


FIG. 4. — Culture R sur pomme de terre.

Le développement prend tout d'abord un aspect granuleux comme si les *Brucella* poussaient agglutinées ; puis il se

forme des flocons qui se déposent tandis que le liquide s'éclaircit ; à la surface subsiste une très mince pellicule microbienne blanc-jaunâtre ; la paroi du ballon se recouvre d'une sorte de filet, ténu près de la surface et plus dense vers le fond, tandis que la masse du liquide reste presque limpide (fig. 6).

La culture en bouillon glycérimé de pH initial 7,4 donne,

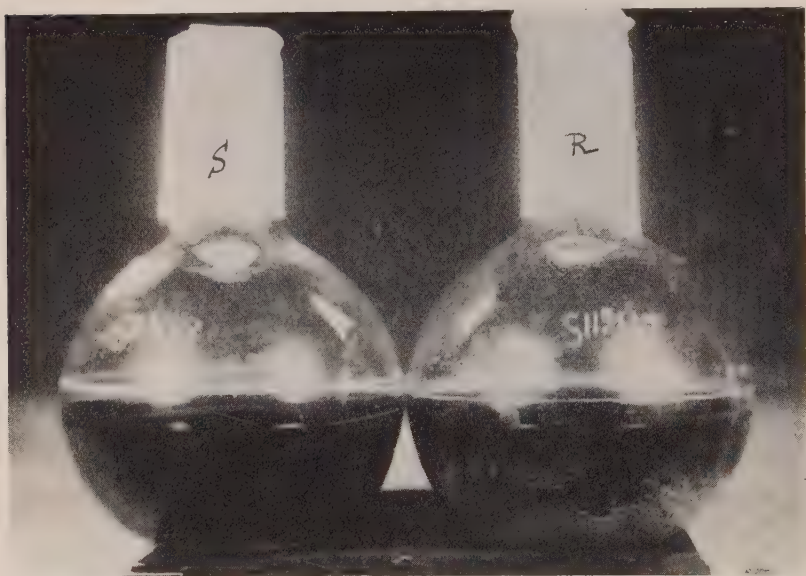


FIG. 5. — Culture "S" en bouillon glycérimé ;
culture "R" en bouillon glycérimé.

au bout de trois semaines, une acidité de pH 4,9 ; au bout de six semaines, le milieu est redevenu alcalin (pH 7,2).

Sur bouillon ordinaire, le milieu reste alcalin (pH 7,1).

Les bacilles ne se développent ni sur gélose ni sur bouillon à la température du laboratoire (20 à 30° environ).

La bactérie résiste seulement dix à quinze minutes à une température de 56°.

Sur pomme de terre, le type R se développe très lentement : ce n'est qu'après une semaine de séjour à l'étuve que se forment des colonies granuleuses ressemblant à celles du

bacille de Koch (fig. 8). Elles se développent aussi bien en milieu basique (pH = 8) qu'en milieu acide (pH = 6,5).

La réaction sur *bouillon* et sur gélose sucrés ou mannités (glucose, lactose, lévulose, saccharose) et « Endo », ainsi que sur la gélose sucrée ou mannitée tournesolée (glucose, lactose, lévulose, maltose et saccharose), ne se différencie aucunement de celle que donne la souche précédemment décrite (type S).

Toutefois, si on compare le milieu « Endo » portant, d'une part, une colonie R, d'autre part une colonie S, il est légèrement plus coloré dans le premier cas que dans le second.

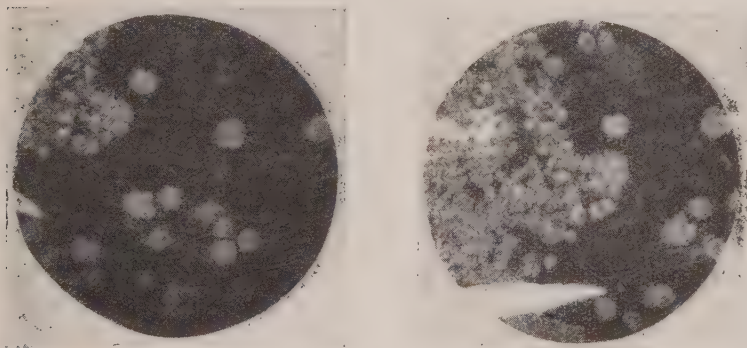


FIG. 6. — Colonies « R » âgées sur gélose.

De même les souches R n'attaquent et ne fermentent pas les sucres.

Les cultures sur gélose sucrée sont plus précoces et plus abondantes, par comparaison avec ce que l'on obtient sur gélose ordinaire ou glycinée.

Pour conserver le type R, il est nécessaire de le réensemencer toutes les trois semaines si on le garde au laboratoire (20°) ou toutes les six semaines si on le garde à la glacière. La distinction des souches S et R ne présente pas de difficultés si la culture est faite sur pomme de terre ou sur bouillon glyciné.

La forme R conserve ses caractères au cours des générations si on la cultive sur son milieu d'origine, qui a été la gélose ordinaire dans nos essais. Mais si le milieu de culture change, il peut arriver, comme nous avons pu le constater

TABLEAU II. — Agglutination (différents types de *Br. abortus* : Neuville, S et R) par des sérums homologues et hétérologues.

ANTIGÈNE	SÉRUMS examinés homologues	ESSAIS D'AGGLUTINATION AUX TAUX SUIVANTS								
		1/30	1/60	1/100	1/300	1/600	1/1.000	1/3.000	1/6.000	1/10.000
Neuville .	Bovin . .	+	+	+	+	+	+	+	Traces.	0
	Lapin . .	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	Cobaye .	+	+	+	+	+	+	0	0	0
S.	Bovin . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lapin . .	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	Cobaye .	+	+	+	+	+	+	Traces.	0	0
R	Bovin . .	+	+	+	Traces.	0	0	0	0	0
	Lapin . .	+	+	+	Traces.	0	0	0	0	0
	Cobaye .	+	+	+	0	0	0	0	0	0
ANTIGÈNE	SÉRUMS hétérologues	ESSAIS D'AGGLUTINATION AUX TAUX SUIVANTS								
		1/30	1/60	1/100	1/300	1/600	1/1.000	1/3.000	1/6.000	1/10.000
Neuville .	Lapin R .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cobaye R .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S.	Lapin R .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cobaye R .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	Lapin S .	+	+	+	Traces.					
	Cobaye S .	+	+	Traces.						

+, réaction positive; 0, réaction négative.

Absorption : Le sérum de lapin ou de cobaye ainsi préparé perd toutes ses propriétés agglutinantes lorsqu'il a été absorbé par la *Brucella* homologue et le liquide surnageant devient absolument limpide.

Précipitation : L'antigène utilisé pour cette épreuve a été préparé de la même manière que précédemment : les sérums étudiés donnent des réactions positives, mais l'anneau formé au contact des deux solutions (sérum + antigène) est plus mince que précédemment et disparaît plus vite.

Déviation du complément : Pour effectuer cette réaction,

nous avons dû procéder à cinq lavages de l'antigène avec de l'eau physiologique car, utilisé directement après la récolte, il avait des propriétés anti-complémentaires. Après ce lavage, il a pu être utilisé même à une concentration plus grande que celle adoptée pour les réactions d'agglutination.

A part cela, la technique et le mode opératoire étaient les mêmes que ceux que nous avons utilisés plus haut. Les résultats sont indiqués dans le tableau IV.

De ce qui précède, il résulte :

1° que la valeur agglutinante de l'antigène S (passage par cobaye tuberculeux) est de beaucoup supérieure à celle de la souche bovin Neuville (souche initiale) et à celle de la variante R ;

2° que les sérums préparés par l'antigène S sont capables de réagir avec les deux antigènes (homologue et hétérologue) ; tandis que les sérums d'animaux préparés avec l'antigène R réagissent seulement avec leur *propre* antigène et nullement avec l'antigène hétérologue ;

3° que les sérums des vaches atteintes d'avortement épizootique possède des propriétés agglutinantes vis-à-vis des deux variantes.

TABLEAU III. — Résultats des agglutinations après absorption.

1. Sérum anti-Neuville absorbé par l'antigène homologue :		5. Sérum anti-Neuville absorbé par l'antigène hétérologue R :	
Neuville	1/15-1/60	Neuville	1/1.000
R.	1/60-1/100	R.	0
2. Sérum anti-S absorbé par l'antigène homologue :		6. Sérum anti-S absorbé par l'antigène R hétérologue :	
S	1/15 (insignifiant).	S	1/2.000
R	1/60-1/100 (traces).	R	0
3. Sérum anti-R absorbé par l'antigène homologue R :		7. Sérum anti-R absorbé par l'antigène S hétérologue :	
R	0	R	1/100 (traces), 1/300
S	0	S	0
4. Sérum bovin absorbé par l'antigène S :		8. Sérum bovin absorbé par l'antigène R :	
S	1/15 (traces), 1/30 (insignifiant).	R	0
R	1/100-1/300 (traces).	S	1/600 (traces), 1/1.000

TABLEAU IV. — Recherches sur les anticorps du sérum anti-brucellique par déviation du complément avec diverses variétés Neuville, S et R du bacille de Bang.

DOSES décroissantes de sérum anti-brucellique dilué au 1/5	SÉRUM ANTI-S		SÉRUM ANTI-R		SÉRUM BOVIN		
	Lapin		Cobaye				
	Variétés d'antigènes		Variétés d'antigènes		Variétés d'antigènes		
	S	R	S	R	Neuville	S	R
1/10	++	+++	++	++	++	++	++
1/20	++	++	++	++	++	++	++
1/40	++	++	++	++	++	++	++
1/80	++	++	++	++	++	++	++
1/160	++	++	++	++	++	++	++
1/320	++	+	++	+	++	++	++
1/640	++	0	++	0	++	++	++
1/1 280	++	0	++	0	++	++	++
1/2 560	0	0	++	0	0	++	0
					0	0	0

Nota. — L'antigène R a dû être lavé 5 fois consécutives à l'eau physiologique pour donner de bons résultats; les + représentent les degrés de la réaction.

Nota. — L'antigène R a dû être lavé 5 fois consécutives à l'eau physiologique pour donner de bons résultats; les + représentent les degrés de la réaction.

GROUPE	TEMPS d'inoculation de la brucellose en jours	MILIEU		PRES				
		Gélose	Bouillon	animal tuberculeux				
				Sang	Rate	Foie	Liquide péritonéal	Apparition des cultures
Animaux tuberculisés.	1	+	+		+		+	24 h.
	2	+	+				+	24 h.
	3	+	+		+			24 h.
	4	+	+		+			24 h.
	5	+	+		+			24 h.
	6	+	+		+			24 h.
	7	+	+		+			24 h.
	8	+	+		+			24 h.
	9	+	+		+	+		24 h.
	10	+	+		+	+		24 h.
	11	+	+		+	+		24 h.
	12	+	+		+	+		24 h.
	13	+	+		+	+		24 h.
	14	+	+		+	+		24 h.
	15	+	+		+	+		24 h.
Animaux ayant reçu du BCG (deux semaines)	1	+			+		+	3 j.
	2	+			+			4 j.
	3	+			+			3 j.
	4	+			+			4 j.
	5	+			+			5 j.
	6	+						
	7	+						
	8	+						
	9	+						
	10	+						
	11	+						
	12	+						
Animaux ayant reçu des bacilles tuberculeux morts.	1	+	+				+	24 h.
	2	+	+					4 j.
	3	+	+		+			
	4	+	+					
	5	+	+					
	6	+	+					
	7	+	+					
	8	+	+		+			1 j.
	9	+	+		+			1 j.
	10	+	+					
	11	+	+					
	12	+	+		+			4 j.

S CHEZ				OBSERVATIONS
de contrôle non tuberculeux				
Rate	Foie	Liquide péritonéal	Apparition des cultures en jours	
+		++ ++ +	23 22 23	Cultures dans tous les organes après 48 heures. Cultures dans la rate après 48 heures. Rien. Si l'on fait le prélèvement à un stade plus avancé sur les animaux de contrôle, on décèle le bacille de Bang.
+				
				Plus d'apparition de bacilles de Bang.
				Bacilles dans les organes génitaux. Apparitions sporadiques de bacilles de Bang.

Du tableau précédent il ressort que les antigènes Neuville et S possèdent de fortes propriétés antigènes vis-à-vis de leur sérum homologue, mais aucune vis-à-vis du sérum hétérologue. Quant à l'antigène R, dont les propriétés antigènes vis-à-vis du sérum homologue sont plus faibles que celles de l'antigène S, il réagit à la fois avec les deux sérums ; mais la réaction avec le sérum S est encore moins marquée qu'avec le sérum R.

Nous pouvons condenser le mécanisme de toutes les réactions dans le schéma ci-après :

SÉRUM (obtenu avec souche)	DEGRÉ DE LA RÉACTION	ANTIGÈNE
S = I (Burnet).	Très fort.	S = I
S = I (Burnet).	Assez fort.	R = II
R = 2 (Burnet).	Assez fort	R = II
	(seulement vis-à-vis de R).	
ANTIGÈNE	DEGRÉ DE LA RÉACTION*	SÉRUM
R = II	Fort.	R = II
R = II	Moins fort.	S = I
S = I	Très fort	S = I
	(seulement vis-à-vis de S).	

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux qu'obtint Burnet avec *Br. melitensis* et *Br. abortus*. D'après cet auteur, le sérum d'un lapin immunisé par l'antigène I, agglutine très fortement l'antigène I, faiblement l'antigène II. Le sérum d'un lapin traité par l'antigène II agglutine assez bien l'antigène II, pas du tout l'antigène I. L'antigène I a la désignation S, l'antigène II la désignation R. Parmi les *melitensis-abortus*, Burnet distingue deux groupes : le groupe I, qui correspond au *melitensis-abortus* et le groupe II qui correspond au *paramelitensis-paraabortus*.

Nos observations sont en désaccord avec celles de certains auteurs qui auraient obtenu la variété R *in vitro*. On peut expliquer que l'antigène S n'a aucune propriété antigène vis-à-vis du sérum hétérologue anti-R parce que si l'on essaie d'absorber le sérum anti-R par l'antigène hétérologue S, le sérum *anti-R* qui reste est capable d'agglutiner seulement l'antigène homologue R.

De toute évidence, ainsi qu'il résulte de leurs expériences, les auteurs n'ont opéré qu'avec un seul type S, car l'antigène qu'ils ont dénommé type R possède, en réalité, les propriétés caractéristiques du type S. Leur type R se différencie uniquement par ses plus faibles propriétés antigènes vis-à-vis du type dénommé S.

Or, cette seule raison est insuffisante pour autoriser sa classification dans une catégorie spécifiquement différente. Les propriétés antigènes de cette variété sont, en effet, fréquemment d'intensité différente et elle est très caractéristique pour *B. abortus*.

D'autre part, l'antigène S absorbant les agglutines du sérum homologue anti-S, le liquide surnageant reste capable d'agir seulement avec l'antigène hétérologue R (l'action sur S est insignifiante). Les sérums bovins possèdent des propriétés agglutinantes vis-à-vis des deux types S et R. Si l'on absorbe l'un, l'autre reste capable de réagir à son tour avec son antigène (voir tableau III), mais plus faiblement qu'avant l'absorption (voir tableau II).

Du tableau ci-contre, il résulte clairement que l'infection tuberculeuse favorise le développement du bacille de Bang. On décèle celui-ci, presque à coup sûr, dès la vingt-quatrième heure après l'inoculation jusqu'au quinzième jour. De plus, la culture ainsi obtenue est particulièrement active, car, inoculée à des cobayes sains, elle provoque un abcès au point d'inoculation et la mort en moins d'un mois.

Par contre, l'inoculation préalable de BGG empêche le développement du bacille de Bang, qui n'est décelable que pendant la première semaine qui suit l'inoculation.

D'autre part, les bacilles tuberculeux morts ne semblent pas exercer d'effet bien défini.

Ceci correspond absolument au résultat de nos expériences, présentées ailleurs, sur la formation des anticorps antibrucelliques (agglutinines, précipitines) chez les animaux tuberculeux traités par le BCG ou avec les bacilles tuberculeux morts [22].

Expériences *in vitro*.

Pour ces essais, nous avons choisi des souches tuberculeuses de types humain et bovin d'âges différents (deux semaines à trois mois). Les tubes ont été ensuite « ensemencés » avec du bacille de Bang puis placés dans l'étuve à 37° pendant un mois : nous avons fait des prélèvements pour surveiller ce que devenait le bacille de Bang dans ces conditions.

D'autre part, nous avons ensemencé *Brucella bovis* sur des milieux solides et liquides ; préalablement, nous avions étalé de la pulpe d'organes d'animaux tuberculeux (rate, foie, sang) ou répandu du liquide péritonéal et nous avons procédé aux mêmes examens.

Dans aucune de ces expériences, nous n'avons constaté de mutation dans les caractères de la souche soumise à l'essai.

Toutefois, dans le second cas, nous avons constaté que les conditions de culture où l'on plaçait le bacille de Bang rendaient son développement plus précoce et plus abondant, par comparaison avec ce que l'on obtenait sur gélose ordinaire glycérinée.

Résumé et conclusions.

1° En général, les *Brucella* manquent de fixité dans leurs caractères morphologiques : ceci explique que nous avons pu, avec notre souche Neuville, être témoin d'une dissociation en types R et S et d'une transformation de S en R. La dissociation se produit plus facilement *in vivo* chez des cobayes atteints de tuberculose que chez des sujets sains.

2° La croissance de la souche S se manifeste par l'apparition d'un trouble du bouillon, puis d'un dépôt accompagné d'une légère clarification du milieu. La souche R se développe en très petits amas agglutinés qui se déposent rapidement : le milieu devient clair alors qu'à la surface subsiste une très mince pellicule.

Sur gélose, le type S donne une culture crémeuse, homogène ; les colonies sont circulaires, transparentes, de couleur claire, avec une légère fluorescence bleue.

Sur pomme de terre glycélinée, la forme S donne une culture homogène, luisante, crémeuse, rappelant les caractères du bacille de la morve.

La variété R se développe très lentement et donne des colonies granuleuses ressemblant à celles de bacilles de Koch.

La culture de type R donne des colonies granuleuses, cireuses et sèches ; elles n'ont pas de forme bien définie : elles sont blanches avec bords bleutés, *opaques*.

3° La souche S s'émulsionne très facilement dans l'eau physiologique et la solution reste longtemps trouble, même si l'on élève la température. La variété R ne s'émulsionne que très difficilement et agglutine spontanément sous l'action de la chaleur.

4° La variété S se développe facilement sur les milieux liquides et solides à la température du laboratoire (20-30°) ; la variété R ne se développe qu'à la température de l'étuve (37°).

5° S et R diffèrent aussi du point de vue sérologique : l'antigène S est capable de produire, chez les animaux, un sérum susceptible de réagir aussi bien avec les antigènes homologues qu'avec les antigènes hétérologues, tandis que l'antigène R ne donne qu'un sérum capable seulement de réagir vis-à-vis de son antigène homologue R. De plus, la valeur agglutinante de l'antigène S est supérieure à celle de type R.

6° La virulence, pour le cobaye, de l'antigène S est beaucoup plus forte que celle de l'antigène R. Le premier voit sa virulence encore augmentée par passage sur le cobaye tuberculeux ; il est alors capable de provoquer l'apparition d'abcès et conduit presque toujours l'animal à la mort, alors que ceux auxquels on inocule le bacille R guérissent le plus souvent. L'infection tuberculeuse semble donc accroître les propriétés pathogènes de la souche S.

7° Le pH du bouillon glycéliné devient moins acide (6,2) avec la souche S qu'avec la souche R (pH 4,9).

8° La variante S résiste mieux à l'action destructrice de la chaleur (S résiste pendant trente minutes à 56°, tandis que la variante R résiste seulement dix à quinze minutes à la même température).

9° La morphologie des variétés S et R ne diffère pas suffisamment pour que l'on puisse en faire un critérium distinctif.

En général, les bacilles de la variante R sont courts, plus minces et plus granuleux que ceux de la variante S.

10° Le milieu « Endo » est plus coloré par R que par S.

11° La variante S isolée du cobaye tuberculeux est beaucoup plus sensible aux matières colorantes que la souche bovine.

12° *In vitro*, la culture en présence du bacille de Koch ne favorise pas l'apparition du phénomène de dissociation.

Je remercie mon éminent ami M. Rinjard, Directeur du Laboratoire de recherches vétérinaires, qui m'a fourni la souche du bacille de Bang et les sérums à l'aide desquels j'ai pu effectuer mes expériences. Je lui suis également très reconnaissant d'avoir bien voulu me permettre d'exécuter les photographies dans son laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARKWRIGHT (J. A.). *Journ. Path. and Bact.*, **23**, 1920, p. 36 ; *Brit. Journ. Exp. Path.*, **5**, 1924, p. 104.
- [2] BAERTHLEIN (K.). *Zentralbl. für Bakteriол.*, I. O., **66**, 1912, p. 21 ; *Ibid.*, **81**, 1918, p. 369.
- [3] COWAN (Mary G.). *J. Infect. Dis.*, **36**, 1925, p. 439.
- [4] BUCHNER (H.). *Ueber die Exp. Erzeugung. d. Milzbrandcont. a. d. Heupizlen*, Munich, 1883.
- [5] BRUCE et WHITE. *Med. Research Council, Sp. Rep.*. Série n° 91, 1925.
- [6] BURNET (Et.). *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1925 ; *Ibid.*, p. 384.
- [7] EISENBERG. *Zent. für Bakteriол.*, I. O., **73**, 1914, p. 81-448.
- [8] FIRTOH (G.). *Arch. für Hyg.*, **8**, 1888, p. 369.
- [9] GRIFFITH (A. S.). *A system of Bacteriol.*, Londres, **5**, 1930, p. 196.
- [10] HADLEY (L.). *Journ. of Infect. Dis.*, **40**, 1927, p. 1.
- [11] JULIANELLE (L.). *J. Exp. Med.*, **44**, 1926, p. 683.
- [12] KRUSE (W.). *Die Mikroorganismen, Variabilität der Mikroorganismen*, 1896, p. 475.
- [13] KOWALENKO (A.). *Zeitschr. für Hyg.*, **66**, 1910, p. 277.
- [14] MOSSINI (R.). *Arch. für Hyg.*, **61**, 1907, p. 250.
- [15] NÆGELI (C.). *Die niederen Pilzen*, Munich, 1877 ; *Untersuchungen über die niederen Pilzen*, Munich, 1882.
- [16] NEISSER (M.). *Zent. für Bakteriол.*, I. Ref., **38**, 1906, p. 98.
- [17] ROSS (G. R.). *Journ. of Hyg.*, **25**, 1927, p. 279-419.
- [18] REIMAN (H.). *Journ. exp. Med.*, **41**, 1925, p. 587.
- [19] DE SANCTIS-MONALDI, *Ces Annales*, **2**, 1932, p. 614.

- [20] SARNOWIEC (W.). *Panst. Inst. Nauk. G. W.*, Pulawy, **12**, 1931 ; *Wiadomosci Weter.*, Warszawa, **154**, 1933.
- [21] SARNOWIEC (W.). *C. R. S. B.*, 1934, p. 30 ; *C. R. S. B.*, 1935, p. 1053 ; *C. R. S. B.*, 1935, p. 1162.
- [22] SARNOWIEC (W.) *Ces Annales*, 1935, p. 175.
- [23] SOULE (M.). *Journ. Inf. Dis.*, **42**, 1928, p. 93.
- [24] SZYMANOWSKY (Z.) et FRENZŁOWA (J.). *Wiadomosci veter.*, Warszawa, **117**, 1930, p. 109.
- [25] TOPLEY (W.) et AYRTON (J.). *Journ. Hyg.*, **22**, 1924.
- [26] WEIL (E.) et FELIX (A.). *Wien. klin. Woch.*, **30**, 1917, p. 393.

ETUDE SUR LA VITALITÉ DES MICROBES

par L. RUBENTSCHIK et S. S. CHAIT.

(*Laboratoire de Microbiologie. Université d'Odessa.*)

La littérature microbiologique contient beaucoup de données relatives à la vitalité des microbes.

Ainsi, Bodouin [2] a trouvé une microflore vivante de bactéries dans un sépulcre romain resté clos durant mille huit cents ans. Des levures de bière viables ont été isolées du résidu trouvé au fond de cruches découvertes pendant les fouilles des Pyramides [6]. Oméliansky [26] a trouvé des bactéries, des levures et des moisissures diverses dans la trompe d'un mammoth resté enfoui pendant des dizaines de milliers d'années dans le sol congelé de la Sibérie. Des bactéries vivantes, sporogènes et asporogènes, ont été trouvées dans divers échantillons de houille jusqu'à 4.000 mètres de profondeur, [16, 17] ainsi que dans des dépôts précambriens [19]. Lipman [20] a signalé la présence de bactéries vivantes dans les météorites (aérolithes). Ces bactéries, envisagées par Lipman comme provenant d'autres planètes, ne se distinguaient nullement des cocci et des bâtonnets vulgaires.

Il convient cependant de n'accepter ces faits qu'avec une certaine réserve. Les observations faites sur la vitalité des microbes dans des conditions naturelles ne sont pas à l'abri d'erreurs possibles. Oméliansky [26] lui-même a émis l'hypothèse que les microorganismes, isolés par lui de la trompe d'un mammoth, étaient des représentants vulgaires de la microflore aérienne. Les conditions dans lesquelles se trouvait le mammoth avant et après avoir été découvert n'excluent pas la possibilité que le matériel examiné ait pu être infecté. Quant à l'origine des microbes trouvés dans la houille, les opinions diffèrent. Lieske [16, 17] suppose qu'ils étaient apportés du dehors. Lipman [18] affirme que ces microbes ont conservé leur viabilité depuis la période carbonifère, c'est-à-dire durant des dizaines de millions d'années.

Mais les données de Farrell et de Turner [11] contredisent

l'avis de Lipman. Ces auteurs ont démontré que les échantillons de charbon compact sont toujours stériles, tandis que le charbon présentant des fissures microscopiques contient des microbes apportés évidemment par les eaux du sol. En ce qui concerne la découverte de microbes vivants dans les aéroolithes, faite par Lipman, sa méthode de travail inspire certains doutes [12, 33].

En passant aux données expérimentales plus précises, nous trouvons aussi une série d'indications montrant que les microbes peuvent rester vivants des années et même des dizaines d'années. Ainsi, la bactérie lumineuse (*Bact. fischeri*) a conservé sa viabilité pendant quatorze mois sur gélose dans une atmosphère d'hydrogène [10], *Pseudomonas campestris* sur des semences desséchées de chou où il se trouvait depuis plus d'un an [3]. Pauli [28] a proposé une méthode de conservation des microbes en desséchant la suspension bactérienne (dans le sérum de cheval) et en conservant dans le vide le résidu obtenu : beaucoup de bactéries (aérobies et anaérobies, sporogènes et asporogènes) traitées de la sorte survivent plus de six ans. On a trouvé une microflore produisant de l'acide lactique dans des ferments secs, conservés au laboratoire pendant dix ans [32]. Son activité était toutefois notablement affaiblie. Oméliansky [27] a desséché une culture d'*Azotobacter chroococcum* sur gélose dextrinée et y a trouvé, au bout de dix ans, des cellules viables de cette bactérie. Lipman et Burgess [21] ont isolé l'*Azotobacter* du sol séché à l'air et conservé au laboratoire durant vingt ans. Dans les expériences de Stapp [31], quelques souches de *Bact. radiculicola* ont été conservées et furent capables d'infecter des plantes après être restées quinze ans sur gélose à la carotte inclinée dans des vases de verre soudés. Miquel [23] a desséché un échantillon de sol et l'a laissé pendant seize ans à la température de 30° C. Ce terme écoulé, le sol contenait 3 millions de bactéries vivantes au lieu du nombre initial de 6 millions et demi par gramme. Kiefer [14] a montré que quelques bactéries pathogènes asporogènes survivent jusqu'à vingt ans sur gélose dans des tubes soudés et conservent toujours leur virulence. *Serratia marcescens*, d'après Deacon [4], peut survivre vingt-deux ans et demi dans un milieu en présence des produits de son métabolisme, à condi-

tion que la pression partielle de l'oxygène soit diminuée. Meissner [22] a observé que quelques levures, après être restées treize ans sans réensemencements dans une solution de 10 p. 100 de saccharose, non seulement sont restées vivantes, mais encore leur activité fermentative avait augmenté. Les levures de vin de Wurtemberg, les levures de bières Karlsberg I et quelques levures sauvages peuvent conserver durant vingt ans leur viabilité dans cette solution [7]. Quelques espèces de levures et de moisissures resteraient vivantes pendant trente ans, d'après Klöcker [15]. Hopkins [9] a trouvé des levures vivantes dans une bière âgée de cinquante ans, et Gayon et Dubourg [8] ont trouvé des levures et des bactéries dans un vin centenaire (Bordeaux). Nestler [24] a signalé la présence de 1.640 bactéries dans 1 gramme de sol séché, adhérant au rhizome d'une mousse conservée pendant quatre-vingt-douze ans dans un herbier. Le matériel examiné par lui ne contenait que des espèces sporogènes (*Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*).

L'expérience suivante a été entreprise dans notre laboratoire au mois d'août 1901, à l'initiative de feu M. le professeur J.-J. Bardach. La boue noire du liman (1) « Soukhoin » (près d'Odessa), plongée dans l'eau du même liman, fut placée dans 50 tubes de Gruber. Chaque tube (ayant une capacité d'à peu près 30 cent. cubes) contenait 10 grammes de boue et 10 cent. cubes d'eau. Les tubes étaient répartis par vingt-cinq en deux groupes. Les tubes du premier groupe furent remplis, à la pompe, d'acide carbonique jusqu'à ce que l'air en fût complètement chassé, après quoi, ils furent soudés. Les tubes du second groupe furent traités de même, seulement au lieu d'acide carbonique, on se servait d'hydrogène. La boue fut conservée au laboratoire à la température de la chambre dans des conditions strictement anaérobies jusqu'à avril-octobre 1934, c'est-à-dire pendant trente-trois ans ; après quoi, elle a été soumise à l'examen.

Nous nous sommes alors posé les problèmes suivants :

1° Détermination du nombre de microbes de la boue végé-

(1) Lac salé.

tant sur la gélose nutritive dans des conditions aérobies et anaérobies ;

2° Détermination du nombre général des microbes de la boue ;

3° Examen de la boue quant à la présence des représentants des groupes physiologiques suivants : germes de la putréfaction, de la dénitrification, de la nitrification, de la décomposition de la cellulose, de la réduction des sulfates, de la fixation de l'azote, de l'oxydation des sulfures.

Avant de passer à cette étude, nous avons révisé minutieusement tous les tubes. L'inspection macroscopique révéla la pénétration de l'air dans quelques-uns d'entre eux. La boue y était oxydée et s'était transformée en substrat gris et l'eau du liman était partiellement ou entièrement évaporée. Ces tubes endommagés ont été exclus et on a pris pour l'examen 6 tubes de chaque groupe contenant la boue complètement noire et une couche d'eau du liman non modifiée. Avant d'être ouverts, ces tubes ont été soumis au traitement suivant : d'abord, ils furent lavés avec de l'eau savonneuse, ensuite essuyés avec de l'ouate stérilisée, traités après avec de l'alcool à 96 p. 100, immergés dans une solution de sublimé à 0,1 p. 100 et enfin essuyés avec de l'ouate stérilisée. On plaçait les tubes après ce traitement dans l'étuve stérilisée de Hansen où on exécutait toutes les manipulations ultérieures (ouverture des tubes, dilution du matériel, ensemencement). On se lavait soigneusement les mains avec de l'eau savonneuse et ensuite avec de l'alcool à 96 p. 100. Pour ouvrir le tube, on faisait dans sa partie supérieure une incision avec une lime stérile, après quoi, à petits coups, on parvenait à casser le tube à la ligne de l'incision. On versait alors l'eau du liman dans un tube stérile et on examinait la boue.

Pour définir le nombre de microbes dans la boue par la méthode de plaques, nous nous sommes servis de gélose nutritive peptonée, faiblement alcaline, à laquelle nous avons ajouté du chlorure de sodium (3 p. 100). On se servait pour les ensemencements de boîtes de Petri dans des conditions aérobies et de tubes de Vignal-Veillon dans des conditions anaérobies. La dilution de la boue était 1/1.000, la température de culture 28 à 30° C. Au bout de dix jours, on comptait le nombre des colonies.

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau I.

L'étude bactérioscopique démontra que sur la gélose nutritive peptonée, se développent exclusivement des bactéries en forme de bâtonnets. Nous n'y avons observé ni levures, ni moisissures, ni actinomycètes.

TABLEAU I. — Nombre de microbes dans 1 gramme de boue.

TUBES AVEC CO ₂		TUBES AVEC H ₂	
Aérobies	Anaérobies	Aérobies	Anaérobies
300.000	64.000	400.000	72.000

Pour déterminer combien de spores, capables de germer sur gélose, s'étaient conservées dans la boue, nous avons réchauffé la suspension de boue dans l'eau à 80° C. durant dix minutes, après quoi nous avonsensemencé le matériel pasteurisé en boîtes de Petri.

Résultats obtenus :

1 gramme de boue humide (tubes avec CO_2) contenait 40.000 spores bactériennes ;

1 gramme de boue humide (tubes avec H_2) contenait 25.000 spores bactériennes.

Pour définir le nombre général des microbes dans la boue, nous avons employé la méthode directe microscopique (méthode simplifiée de Winogradsky). On étalait une suspension non épaisse de boue dans l'eau sur le porte-objet (surface = 4 cent. carrés), on la fixait à la flamme, on y ajoutait de la gélose à 0,1 p. 100 et on la colorait durant soixante minutes avec du phénol-érythrosine à 5 p. 100.

Les résultats de la détermination du nombre de microbes furent :

1 gramme de boue (tubes avec CO_2) contenait 40 millions de microbes ;

1 gramme de boue (tubes avec H_2) contenait 38 millions de microbes.

Pour déceler les microbes de la putréfaction, onensemencait 1 à 10—⁶ gramme de boue dans des tubes contenant chacun 10 cent. cubes d'eau peptonée à 1 p. 100 et de chlorure de sodium à 3 p. 100. On suspendait dans chacun des tubes des bandes stériles de papier de tournesol rouge et de papier à l'acétate de plomb. La température de culture était de 28° à 30° C (2). Les tubes avec CO_2 , ont donné le même résultat que les tubes avec H_2 :

Nombre de microbes produisant l'ammoniaque : 10.000 dans 1 gramme de boue.

Nombre de microbes formant de l'hydrogène sulfuré : 1.000 dans 1 gramme de boue.

Pour déceler les microbes de la nitrification, on a fait des ensemencements de boue dans le milieu d'Oméliansky (pour la première phase de la nitrification) avec du chlorure de sodium à 3 p. 100. Après avoir versé 30 cent. cubes du milieu dans chaque flacon d'Erlenmeyer de 250 cent. cubes, on y introduisait de 1 à 10—⁵ gramme de boue.

Nous n'avons observé en aucun des cas la formation de N_2O_3 ou de N_2O_5 . Ainsi, la boue ne contenait pas de microbes viables de la nitrification.

Pour déceler les microbes de la dénitrification, nous avons utilisé le milieu de Giltay avec du chlorure de sodium à 3 p. 100. On introduisait dans chaque tube contenant une haute couche de liquide (20 cent. cubes) de 1 à 10—⁵ grammes de boue. La formation du gaz ainsi que la disparition de N_2O_3 et de N_2O_5 nous permettaient de juger si la dénitrification avait eu lieu.

On a trouvé dans 1 gramme de boue, dans des tubes avec CO_2 , 1.000 dénitrificateurs réduisant les nitrates jusqu'à l'azote gazeux. 100 de ces germes ont été trouvés dans 1 gramme de boue dans les tubes avec H_2 .

(2) On gardait la même température pour la culture de tous les autres groupes de microbes à l'exception des cas indiqués à part.

Pour découvrir les microbes fixateurs d'azote, on faisait les ensemencements dans le milieu de Winogradsky (pour *Clostridium pasteurianum*) avec du chlorure de sodium à 3 p. 100. On introduisait de 1 à 10—⁵ gramme de boue dans chaque tube contenant 20 cent. cubes de milieu. Nous avons déterminé le développement de *Clostridium pasteurianum* à cette dilution par le dégagement du gaz, par l'odeur d'acide butyrique et par les préparations colorées à l'iode.

On a obtenu les résultats suivants :

1 gramme de boue des tubes avec CO₂ contenait 10 fixateurs d'azote anaérobies (type *Clostridium pasteurianum*), tandis que les tubes avec H₂ n'en contenaient qu'un dans 1 gramme de boue.

Pour déceler les microbes réduisant les sulfates, nous avons employé le milieu de Beijerinck avec du chlorure de sodium à 3 p. 100 en culture anaérobie dans des flacons à goulot étroit, remplis du liquide et fermés hermétiquement par des bouchons. On y ensemait de 1 à 10—⁵ gramme de matériel et après trente jours, on titrait le milieu par l'iode à 0,01 N.

Données obtenues :

Tubes avec CO₂ : 1.000 microbes dans 1 gramme de boue.

Tubes avec H₂ : 10.000 microbes dans 1 gramme de boue.

Pour déceler les sulfo-bactéries, on ensemait dans le milieu de Nathanson avec du chlorure de sodium à 3 p. 100, réparti à raison de 25 cent. cubes par fiole d'Erlenmeyer de 150 cent. cubes. La boue était ajoutée à la dose de 1 à 10—⁴ gramme. L'apparition d'un voile de soufre, ainsi que la diminution de la quantité initiale d'hyposulfite dans le milieu, nous servaient de critérium pour juger du développement des sulfo-bactéries. Après trente jours, on titrait le milieu par 0,01-N d'iode.

Les sulfo-bactéries thioniques n'ont été trouvées dans aucun des échantillons.

Pour déceler les bactéries sulfuriques, nous nous sommes servis du milieu de Borhard (contenant du sulfure de potassium) avec du chlorure de sodium à 3 p. 100. On plaçait la boue analysée (1 à 3 gr.) dans des tubes, on la couvrait d'une couche de 10 cent. cubes du milieu indiqué et on l'exposait à la fenêtre du laboratoire. Dans aucun des ensemencements nous n'avons observé le développement de bactéries sulfuriques.

Pour déceler les microbes anaérobies décomposant la cellulose, nous nous sommes servis du milieu d'Oméliansky avec du chlorure de sodium à 3 p. 100. On versait ce milieu dans les tubes en couche épaisse (20 cent. cubes) et on l'ensemait avec la boue (de 1 à 10—⁵ gr.).

La température de la culture était 35° C. La décomposition du papier à filtrer, la formation de gaz ainsi que la bactérioscopie nous indiquaient la présence des microbes ci-dessus mentionnés. La décomposition du papier et le développement de ces bactéries n'eut lieu que dans quelques tubes contenant 1 gramme de boue.

Pour déceler les microbes aérobie décomposant la cellulose, nous avons employé le milieu de Van Iterson avec du chlorure de sodium à 3 p. 100 et le silico-gel d'après Winogradsky. Dans le premier cas, on versait 30 cent. cubes du milieu dans les flacons d'Erlenmeyer de

250 cent. cubes et on y introduisait des bandes verticales de papier à filtrer. La quantité de boue prise pour chaque ensemencement était de 1 à 10—⁴ gramme.

On a pu découvrir de 0 à 10 microbes dans 1 gramme de boue prise dans les tubes avec CO_2 et de 1 à 100 microbes dans la même quantité de boue prise dans les tubes avec H_2 .

Le silico-gel recevait, outre les ingrédients habituels, un supplément de chlorure de sodium à 3 p. 100. La boue examinée fut distribuée par petites portions sur une rondelle de papier qui couvrait le substrat de silico-gel.

L'examen a montré que des taches de couleur jaune pâle se sont formées autour de quelques parcelles de boue. Pourtant nous n'avons pu déceler dans ces taches ni la décomposition visible du papier, ni la présence de microbes.

Pour le contrôle microbiologique de l'air, nous avons exposé pendant les ensemencements dans l'étuve de Hansen, des tubes, des flacons et des boîtes de Petri ouverts, contenant les milieux nutritifs correspondants.

Les ensemencements achevés, on fermait les cultures témoins et on les plaçait dans les mêmes conditions de température que les cultures d'essais. Il ne s'est développé qu'une colonie dans deux boîtes de Petri à la gélose nutritive. L'une contenait une moisissure, l'autre un *Micrococcus* jaune. Toutes les autres cultures témoins sont restées stériles.

Ainsi la boue de liman, après être restée trente-trois ans au laboratoire dans les conditions indiquées, contenait encore divers microbes viables.

Comme nous l'avons déjà signalé, 1 gramme de boue ensemencé sur gélose nutritive dans des conditions aérobies contenait de 300 à 400.000 microbes. Ces quantités sont assez considérables étant donné que dans la boue fraîche du liman « Soukhoin », la même méthode ne permet de déceler que des millions de microbes par gramme au maximum. Il faut noter que parmi les bactéries qui ont pu survivre, il n'y en a que 25 à 40.000, c'est-à-dire 6,2 à 13,3 p. 100 qui se soient conservées sous la forme de spores.

Reste à déterminer dans quel état se sont conservés les autres microbes de ce groupe.

L'étude bactérioscopique des colonies développées en boîtes de Petri, nous démontra que la plupart d'entre elles contenaient des bactéries normales. Cependant, parmi les colonies d'aspect normal (plates, jusqu'à 2 millimètres de diamètre, avec des bords sinueux), quelques-unes avaient un contenu inhabituel. Au lieu de cellules bactériennes, nous y avons

aperçu des granules ou des corpuscules de forme irrégulière dans la plupart des cas ; il y en avait qui étaient à peine visibles au microscope (jusqu'à $0\ \mu\ 5$).

Ces colonies se sont développées plus tard que les autres (au bout de neuf à dix jours). Réensemencées sur gélose nutritive, elles produisirent les mêmes colonies contenant des bâtonnets normaux à côté des granules ou des corpuscules déjà mentionnés. Les réensemencements ultérieurs n'ont donné que des bâtonnets d'aspect normal. Les formations granulaires décrites, colorées par l'érythrosine, furent aussi décelées dans la boue à l'examen microscopique direct. En nous basant sur ces observations, nous émettons la supposition qu'outre les spores et les cellules végétatives vulgaires, certaines bactéries se sont conservées dans la boue sous la forme de granules ou de corpuscules capables de se transformer dans des conditions favorables en cellules normales. Cette supposition correspond aux vues modernes sur la structure et le développement des bactéries. L'étude du bactériophage et des formes invisibles des bactéries visibles a démontré que les cellules bactériennes peuvent se désagréger en particules (« fragments » ou « débris ») d'une dimension parfois submicroscopique, qui peuvent se transformer de nouveau en cellules bactériennes vulgaires. Il semble que le phénomène s'est produit chez les bactéries qui ont formé les colonies dont nous venons de parler. En rapport avec nos observations, il faut mentionner que Kiefer [14] a trouvé dans des cultures de certaines bactéries pathogènes conservées pendant de nombreuses années sans réensemencements, un « détritit » au lieu de cellules vulgaires. Ce « détritit » donnait une réaction positive d'agglutination et se transformait après réensemencements en cellules vulgaires.

Au nombre des *bactéries sporogènes* développées sur la gélose nutritive se trouvaient les espèces suivantes : *Bac. subtilis* Cohn, *Bac. mesentericus* Trevisan, *Bac. danicus* Löhnis et Westermann, *Bac. ruminatus* Gottheil.

Le calcul par méthode directe démontra qu'il existait 38 à 40 millions de microbes dans 1 gramme de boue. Ces quantités sont insignifiantes, car dans 1 gramme de boue fraîche nous n'avons pas trouvé moins d'un milliard de microbes. On sait

que, selon la méthode de Winogradsky (et ses modifications) on compte les cellules vivantes et mortes, car il est impossible de discerner au microscope les unes des autres. Si le nombre général des microbes dans la boue examinée n'était pas considérable, cela peut être expliqué par l'autolyse des cellules mortes ou bien par le fait que ces dernières avaient perdu la faculté de se colorer par l'érythrosine.

Quant à la flore microbienne de la boue conservée, elle se distinguait quelque peu de celle de la boue fraîche : celle-ci contenait beaucoup de cellules semblables à l'*Azotobacter* qui manquaient complètement dans la boue conservée. Par contre, nous y avons trouvé, mais non dans chaque champ visuel, des bâtonnets et des cocci séparés et en amas. Nous avons vu que les cocci ne se sont pas développés dans les ensemencements de boue sur gélose nutritive, ce qui nous permet de penser que les cocci décelés par la méthode directe étaient morts ou bien se rapportaient au nombre de ceux qui ne peuvent végéter sur le milieu employé. La boue examinée contenait, en outre, une grande quantité de diatomées — intactes ou en débris. Dans cette boue, les cellules analogues à l'*Azotobacter* étaient absentes, fait qui est surtout intéressant à noter parce que dans cette même boue on a pu isoler une bactérie identique à celles décrites par Dianowa et Woroschilowa [5]. Comme cette bactérie est sporogène, elle a dû se conserver probablement non sous la forme de cellules végétatives, mais sous la forme de spores.

Il est indispensable de noter que la quantité de microbes de la putréfaction, de la dénitrification, de la nitrification et de la réduction des sulfates ne constituent qu'à peu près 10 p. 100 du nombre de ces microbes dans la boue fraîche du liman. Quant aux microbes décomposant la cellulose, anaérobies et aérobies, ils se sont conservés en petites quantités et pas dans tous les tubes examinés. Dans les ensemencements, où on observait la décomposition de la cellulose anaérobie, on a pu établir le développement d'une bactérie du type *Bac. cellulosaethanica* Oméliansky. La décomposition de la cellulose aérobie commençait à la limite du liquide et de l'air où le papier à filtrer devenait jaune, visqueux et se désagrégeait.

Les préparations faites de ce papier ont montré un bâtonnet

avec une grande spore ovale prévalant sur toutes les autres cellules en forme de bâtonnets. On n'a pu l'isoler en culture pure. *Cytophaga halophila* (Rubentschik et Goicherman [29], très répandue dans les boues des limans, n'a pas conservé sa vitalité.

Dans les cultures où s'effectuait la réduction des sulfates, nous avons observé le développement de vibrions et de bâtonnets. Les réensemencements sur le milieu solide de Beijerinck dans des tubes étroits soudés ont donné des colonies noires entourées d'une zone du milieu noirci. Dans ces colonies, on a trouvé une bactérie réduisant les sulfates du type de *Vibrio rubentschikii* Baars [1] ainsi que le bâtonnet avec des inclusions de sulfure de fer, cité par Issatchenko [13] comme satellite des bactéries réduisant les sulfates.

Parmi les bactéries fixatrices d'azote libre on n'a trouvé que *Clostridium pasteurianum*. Quant à l'*Azotobacter*, on le rencontre rarement même dans les boues fraîches des limans.

Il est intéressant de noter que dans les cultures de la boue conservée, les processus commençaient assez tôt, presque en même temps que les processus analogues dans les cultures ensemencées avec la boue fraîche :

Putréfaction (formation de NH_3 et de H_2S) — en deux à trois jours.

Dénitrification (commencement de la formation du gaz) — en trois à quatre jours.

Décomposition aérobie de la cellulose (apparition des colonies visibles sur papier) — en cinq jours.

Seule la réduction des sulfates retardait : elle commençait après vingt à trente jours.

Notre attention a été attirée par le fait que la vitalité des microbes fut presque la même dans les tubes à acide carbonique que dans les tubes à hydrogène. Cependant, on sait que CO_2 exerce une influence inhibitrice sur les microorganismes divers. C'est pourquoi on l'utilise pour conserver les produits nutritifs (Nikitinsky) [25]. Quant à nos épreuves, il faut noter que la boue du liman possède une haute faculté d'adsorber différents microbes (Rubentschik, Roisin et Beliansky) [30]. On peut admettre que, étant adsorbés, les microbes deviennent moins sensibles à l'action de l'acide carbonique.

Le fait que nous avons établi la grande vitalité de divers

microbes de la boue, pose la question de savoir dans quel état ils se sont conservés dans ce substrat : s'agit-il d'un arrêt complet des fonctions vitales (anabiose dans le sens de Bachmetiev) ou bien seulement d'un ralentissement extrême ?

Les bactéries asporogènes strictement aérobies comme *Nitrosomonas*, *Cytophaga*, *Thiobacillus thiopharus* (3) n'ont pu survivre dans la boue, comme nous l'avons observé, tandis que des bactéries asporogènes, strictement anaérobies comme celles réduisant les sulfates, ont conservé leur vitalité. Cela confirme l'opinion que dans les conditions strictement anaérobies de notre expérience le métabolisme des bactéries aérobies s'arrêtait, ce qui causait leur mort. Chez les bactéries strictement anaérobies, le métabolisme pouvait durer, quoiqu'il fût très ralenti. C'est grâce à cela, peut-être, qu'elles sont restées vivantes.

Bien que la littérature, comme nous l'avons vu, admettait depuis longtemps la possibilité d'une grande vitalité de certains microbes, les données obtenues par nous présentent un intérêt, non seulement pour la microbiologie des lacs salés, mais aussi pour la microbiologie générale. Cela s'explique d'abord parce que notre essai embrasse des groupes divers de microbes, et puis parce que les conditions de notre expérience étaient tout à fait spécifiques. Le substrat colloïdal d'une composition complexe (la boue) contenant environ 0,4 p. 100 d'hydrogène sulfuré à l'état libre et lié, et environ 1,8 p. 100 de sels divers, l'eau du liman de poids spécifique 3°4 Baumé, l'atmosphère d'acide carbonique ou d'hydrogène : tel est le milieu dans lequel les microbes ci-dessus décrits ont conservé leur viabilité durant trente-trois ans.

CONCLUSIONS.

1° La boue noire du liman (lac salé) « Soukhoïn » couverte de l'eau du liman, conservée pendant trente-trois ans dans des conditions strictement anaérobies (tubes de verre soudés, atmosphère d'hydrogène ou d'acide carbonique) a été soumise à l'étude microbiologique.

(3) Ces bactéries se rencontrent dans la boue fraîche du liman « Soukhoïn ».

2° On a trouvé dans 1 gramme de boueensemencée sur gélose à la viande peptonée, de 300 à 400.000 bactéries dans des conditions aérobies, et de 64 à 74.000 bactéries dans des conditions anaérobies.

3° 6,2 à 13,3 p. 100 seulement des bactéries développées sur ce milieu dans des conditions aérobies se sont conservées dans la boue sous la forme de spores.

4° Certaines observations permettent de supposer qu'à côté des spores et des cellules végétatives, une partie des bactéries s'est conservée dans la boue sous la forme de « fragments » ou de « débris ».

5° A l'aide de la méthode directe microscopique on a réussi à déceler de 38 à 40 millions de microbes dans 1 gramme de boue.

6° On a trouvé les quantités suivantes de microbes de différents groupes physiologiques dans 1 gramme de boue :

Microbes de la putréfaction formant N_2S	1.000
Microbes de la putréfaction formant NH_3	10.000
Microbes de la dénitrification	De 100 à 1.000
Microbes fixateurs de l'azote, anaérobies.	De 1 à 10
Microbes de la réduction des sulfates	De 1.000 à 10.000
Microbes de la décomposition de cellulose, anaérobies.	De 0 à 1
Microbes de la décomposition de cellulose, aérobies	De 0 à 100

7° Les bactéries de la nitrification, les thiobactéries et sulfobactéries ne se sont pas conservées dans la boue.

8° La survie des microbes fut égale dans l'atmosphère d'acide carbonique et dans l'atmosphère d'hydrogène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAARS (J. K.). *Over sulfaatreductie door Bacterien* (DELFT), 1930.
- [2] BODOUIN, cité d'après Omeliansky. *Osnovi microbiologii*, 1931, p. 152 (russe).
- [3] BUCHANAN et FULMER. *Physiology and Biochemistry of Bacteria*, 2, 1930, p. 336.
- [4] DEACON (W. F.). *Science*, 79, 1932, p. 274.
- [5] DIANOWA et WOROSCHILOWA. *Zentrbl. f. Bakt., Abt. II*, 84, 1931, p. 433.
- [6] GRÜSS. *Tageszeitschr. f. Brauerei*, 27, 1929, p. 679.
- [7] HANSEN, cité d'après Sitnicov. *Microbiologia brojeniya*, 1933, p. 140 (russe).

- [8] GAYON et DUBOURG. *Lafar's Handbuch der techn. Mykrobiologie*, **5**, p. 4881.
- [9] HOPKINS (R. H.). *Journ. of Brewing*, **34**, 1928, p. 403.
- [10] HÖLL (S. E.) et SHOUP (Ch. S.). *Journ. of Bact.*, **18**, 1929, p. 95.
- [11] FARREL (M. A.) et TURNER (H. G.). *Journ. of Bact.*, **23**, 1932, p. 155.
- [12] FARREL (M. A.). *Amer. Museum Nov.*, n° 645, 1933, p. 1-3.
- [13] ISSATCHENKO (B. L.). *Izvestia Sanpeterb. Botan. Sada*, 1912 (russe).
- [14] KIEFER (K. H.). *Zentrbl. f. Bakt.*, Abt. I, **90**, 1923, p. 1.
- [15] KLÖCKER, cité d'après Janke. *Technische Mikrobiologie*, **1**, 1924, p. 92.
- [16] LIESKE (R.). *Zeitschr. angew. Chem.*, **41**, 1928, p. 624 ; *Bioch. Zeitschr.*, **250**, 1932, p. 39.
- [17] LIESKE (R.) et HOFFMANN (E.). *Zentrbl. f. Bakt.*, Abt. II, **77**, 1929, p. 305.
- [18] LIPMAN (C. B.). *Journ. of Bact.*, **22**, 1931, p. 183.
- [19] LIPMAN (C. B.). *Science*, **68**, 1928, p. 272.
- [20] LIPMAN (C. B.). *Amer. Museum Nov.*, 588 et 590, 1932.
- [21] LIPMAN et BURGESS (1915), cité d'après Woitkewitch. *Course Microbiologii*, 1932, p. 226 (russe).
- [22] MEISSNER (R.). *Wein und Rebe*, **6**, 1924, p. 244.
- [23] MIQUEL, cité d'après Omeliansky, *Osnovi microbiologii*, 1931, p. 152 (russe).
- [24] NESTLER. *Ber. d. deutsch. bot. Gesell.*, **28**, 1910, p. 7.
- [25] NIKITINSKY. *Chranenie pitevich prodouctov v ouglekislom gase*, 1933 (russe).
- [26] OMELIANSKY (B.). *Archiv biolog. naouk*, **16**, 1911, p. 35 (russe).
- [27] OMELIANSKY (B.). *Troudi oldela selsko-chosajst. microbiologii*, **1**, 1926, p. 85 (russe).
- [28] PAULI (P.). *Bulletino della sezione Italiana Soc. intern. di microbiol.*, **4**, fasc. IX, 1932.
- [29] RUBENTSCHIK et GOICHERMANN. *Troudi institouta kourort. i balneolog.*, **2**, 1933, p. 100 (russe).
- [30] RUBENTSCHIK, ROISIN et BELJANSKY. *Microbiologia*, **3**, 1934 (russe).
- [31] STAPP. *Angew. Bot.*, **6**, 1924, p. 152.
- [32] CHOUDJAKOV. *Selsko-chos. microbiologia*, 1926 (russe).
- [33] WINOGRADSKY (S.). *Bull. Inst. Pasteur*, **20**, 1933, p. 967.

BACTÉRIOLOGIE DES PNEUMONIES DE L'ENFANCE

(TROISIÈME MÉMOIRE)

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES PNEUMOCOQUES DU GROUPE X QUELQUES OBSERVATIONS SUR LA VARIABILITÉ DU PNEUMOCOQUE

par L. K. VIKTOROFF, D. I. OSTROVSKAIA et L. A. LEVTCHENKO.

(*Institut Tarassévitch de contrôle des Sérums et Vaccins*
[Directeur : G. L. KUTCHAIÐZÉ], *Laboratoire de Microbiologie*
[Chef : L. K. VIKTOROFF].)

PREMIÈRE PARTIE

Propriétés biologiques des pneumocoques du groupe X, isolés dans les pneumonies de l'enfance.

Nos recherches ont porté sur la virulence de différents types, leurs propriétés hémolytiques et biochimiques.

TECHNIQUE.

a) DÉTERMINATION DE LA VIRULENCE. — Des doses décroissantes (10^{-1} à 10^{-8} cent. cubes) d'une culture de dix-huit heures en sérum-bouillon ont été inoculées dans le péritoine de souris blanches pesant 16 à 20 grammes. La plus petite dose de culture (en centimètres cubes), tuant la souris en soixante-douze heures, était considérée comme dose léthale minima (DLM).

b) POUVOIR HÉMOLYTIQUE. — Les souches étudiées étaient ensemencées dans du sérum-bouillon additionné de 5 p. 100 de globules rouges humains ; les cultures étaient maintenues pendant quatre-vingt-seize heures à l'étuve. Les modifications

survenues dans les cultures ont été enregistrées quotidiennement d'après le schéma suivant :

- + + + hémolyse complète ;
- + + hémolyse moyenne ;
- + trace d'hémolyse ;
- hémolyse nulle.

c) PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES (1). — Nous avons étudié l'action des souches fraîchement isolées sur l'inuline, la salicine et la mannite. L'ensemencement était pratiqué sur le milieu de Hiss (1 partie de sérum de bœuf, 2 parties d'H₂O dist., 1 p. 100 d'hydrate de carbone ; la teinture de tournesol servait d'indicateur), cinq jours d'étuve. Les résultats étaient enregistrés de la façon suivante :

- + + coagulation du milieu et couleur rouge intense ;
- + rouge intense sans coagulation ;
- ± virage au rouge sans coagulation ;
- réaction nulle.

VIRULENCE DE DIFFÉRENTS PNEUMOCOQUES DU GROUPE X.

Nous avons étudié la virulence de 152 souches de pneumocoque de races différentes.

Les souches ont été considérées comme *peu virulentes* lorsque leur DLM était égale à 10^{-1} à 10^{-3} cent. cube d'une culture de dix-huit heures en sérum-bouillon ; pour les souches virulentes, la DLM était égale à 10^{-4} à 10^{-6} cent. cube de culture ; pour les souches *très virulentes*, la DLM était égale à 10^{-7} à 10^{-8} cent. cube de culture.

Parmi ces souches, 17 p. 100 appartenaient à la première catégorie (peu virulente), 15 p. 100 à la deuxième (virulente) et 38 p. 100 à la troisième (très virulente) [voir fig. 4].

L'étude de la virulence de différentes races de pneumocoques montre que la quantité de souches virulentes varie considérablement suivant le type. C'est ainsi que toutes les souches isolées par nous appartenant aux types XIV (9 souches) et XVII (7 souches) étaient peu virulentes ou avirulentes

(1) Pour les détails, voir L. K. Viktoroff, O. M. Zemtsova et M. H. Sinouchina, *Zentrbl. f. Bakt., I. Orig.*, **130**, 1933, 24.

même ; 88 p. 100 à 75 p. 100 des germes des races XIX, VII et XV étaient également d'une virulence faible ; enfin une quantité considérable de souches peu virulentes ont été trouvées parmi les races XII, VI, X et IX (60 p. 100 à 30 p. 100). Par contre, les germes appartenant aux autres types rentraient, dans la plupart des cas, dans la catégorie des souches virulentes ; ainsi, les 8 souches du type V isolées par nous étaient virulentes ou très virulentes ; ces dernières constituant 88 p. 100 à 90 p. 100 des souches appartenant aux races XX et VIII étaient aussi d'une grande virulence ; 75 p. 100 à 58 p. 100 des souches appartenant aux types XVIII, XXV, IV,

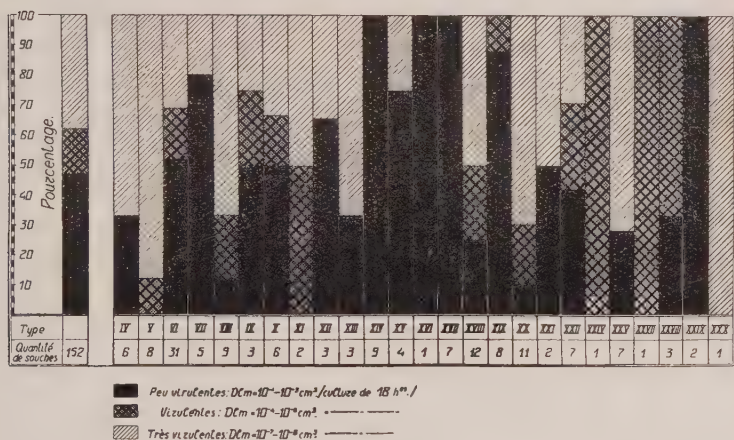


FIG. 1.

XIII et XXII rentraient également dans la catégorie des germes virulents.

Cooper et ses collaborateurs ont trouvé, parmi les pneumocoques isolés dans les pneumonies de l'adulte et des enfants, des germes très virulents ($D_{50} = 10^{-7}$ à 10^{-8} cent. cube) appartenant aux races IV, VIII, XXII et XXV ; les pneumocoques à virulence moins marquée ($D_{50} = 10^{-3}$ à 10^{-5} cent. cubes) se rencontraient parmi les types V, VI, VII, XIV, XIX, XX ; les races IX, X, XII, XV, XVI et XXI contenaient des germes à faible virulence ($D_{50} = 10^{-2}$ cent. cubes) ; enfin, parmi les autres races, les pneumocoques de différente virulence se rencontraient avec une égale fréquence.

D'après les données de Gundel, les pneumocoques du groupe X isolés des pneumonies sont en général de virulence très faible ($DLM = 10^{-1}$ à 10^{-4} cent. cube).

Nos observations, on le voit, confirment dans une certaine mesure les données des auteurs américains. Dans nos recherches, nous avons constaté que le groupe X contient des germes de virulence différente ; celle-ci se maintient pour chaque type à un degré à peu près constant et paraît avoir une propriété relativement stable.

Les souches virulentes, isolées des crachats et conservées dans des conditions convenables (sérum semi-liquide, organes desséchés de souris infectées) et soumises à des passages périodiques sur la Souris, gardent durant des mois et des années leur virulence initiale.

Les souches avirulentes ou à virulence faible restent telles malgré des passages successifs, effectués durant une année. En général, d'après nos observations, on n'arrive à augmenter la virulence qu'en partant de souches dont la DLM ne descend pas au-dessous de 10^{-4} cent. cube. Nos efforts pour augmenter la virulence des germes moins virulents sont restés sans succès.

POUVOIR HÉMOLYTIQUE DES PNEUMOCOQUES.

Parmi les 42 souches de races différentes dont les propriétés hémolytiques ont été étudiées, 29 appartenait à la catégorie des germes virulents et très virulents, 13 souches étaient avirulentes ou peu virulentes. Or, toutes les souches qui présentaient des propriétés hémolytiques rentraient dans la catégorie des germes virulents ; aucun germe de virulence faible ou nulle ne provoquait l'hémolyse (tableau 1). Parmi les pneumocoques étudiés à pouvoir hémolytique intense, nous trouvons des germes du type V (2 souches sur 3 étudiées), du type XX (1 souche sur 3) ; VI (1 souche parmi les 4 examinées) et XIII (1 souche) ; 1 souche de race XVIII a donné une faible hémolyse (sur 2 étudiées).

Des propriétés hémolytiques intenses des pneumocoques du type V ont été également remarquées par Cooper. Les bactériémies fréquentes observées dans les pneumonies occa-

TABLEAU I. — Les propriétés hémolytiques des pneumocoques du groupe X.

TYPE	SOUCHES VIRULENTES			SOUCHES AVIRULENTES		
	Quantité	Hémolyse		Quantité	Hémolyse	
		+	—		+	—
IV				2		2
V	3	2	1			
VI	4	1	3			
VII				1	0	1
VIII	3	0	3			
IX	1	0	1	1	0	1
X	2	0	2			
XI	1	0	1	1	0	1
XII	1	0	1	1	0	1
XIII	1	1	0			
XIV				1	0	1
XV	1	0	1	1	0	1
XVI				1	0	1
XVII				1	0	1
XVIII	2	1	1			
XIX				1	0	1
XX	3	1	2			
XXI	1	0	1			
XXII	2	0	2			
XXIV	1	0	1			
XXV	2	0	2			
XXVII	1	0	1	1	0	1
XXVIII				1	0	1
	29	6	23	13	0	13

sionnées par ces germes seraient dues, d'après cet auteur, à leur grande avidité pour les globules rouges.

Le pouvoir hémolytique est sans aucun doute une propriété qui est intimement liée à la virulence du germe. En effet, les souches hémolytiques n'ont jamais été trouvées dans la catégorie des pneumocoques avirulents ou de faible virulence ; nous les avons, par contre, rencontrées le plus souvent dans les races présentant la plus grande quantité de souches virulentes. Toutefois, un pneumocoque virulent n'est nécessairement pas doué de propriétés hémolytiques. Un grand nombre de germes très virulents en étaient complètement dépourvus.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DES PNEUMOCOQUES DU GROUPE X.

Les recherches de Viktoroff, Zemtsova et Siniouchina sur l'activité biochimique des pneumocoques (isolés par ces auteurs dans les pneumonies de l'adulte), ont montré que toutes les races (les 3 premiers types et les germes du groupe X (sérologiquement non différenciées par eux) agissent de la même façon sur différents hydrates de carbone en fermentant les uns et n'attaquant pas les autres. Exception doit être faite pour la mannite et la salicine ; on rencontre

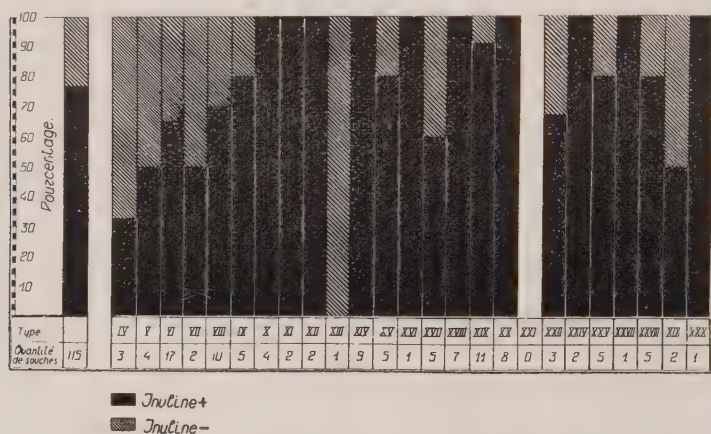


FIG. 2.

dans chaque race des souches à action différente sur ces hydrates de carbone. C'est ainsi que parmi les 49 souches du groupe X, isolées des pneumonies de l'adulte, 53 p. 100 des souches attaquaient les deux hydrates de carbone, 16 p. 100 fermentaient la salicine et n'attaquaient pas la mannite ; pour 14 p. 100 c'était le contraire qu'on observait ; enfin, 15 p. 100 des souches étaient sans action sur les deux hydrates de carbone. De plus, la majorité de ces souches, d'après les données des auteurs cités, fermentaient l'inuline.

Il était intéressant de préciser l'action des pneumocoques du groupe X, isolés dans les pneumonies de l'enfance sur l'inuline, la mannite, la salicine.

Dans ce travail, nous avons étudié les propriétés biochimiques de 115 souches des pneumocoques du groupe X.

Ce qui frappe avant tout (voir fig. 2), c'est la grande quantité de souches (23 p. 100) qui ne fermentent pas l'inuline. Ce chiffre présente des variations considérables suivant les types : les uns (X, XI, XII, XIV, XV, XVIII) n'attaquaient jamais l'inuline ; parmi les autres (IV, V, VII, XVII, VI), les germes fermentant ce sucre se rencontraient très souvent (67 p. 100 à 30 p. 100).

Quant à l'action des pneumocoques sur la mannite et la salicine (voir fig. 3), nous avons constaté que la

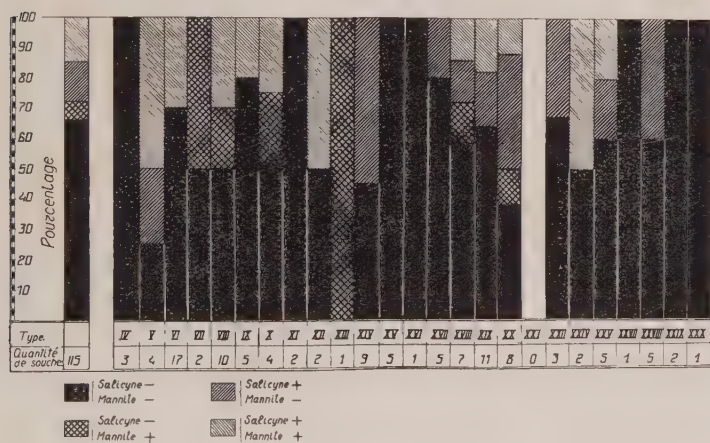


FIG. 3.

plus grande partie (66 p. 100) de nos souches n'attaquaient pas ces hydrates de carbone, 15 p. 100 fermentaient l'un et l'autre, 13 p. 100 fermentaient la salicine et n'attaquaient pas la mannite ; pour 6 p. 100, c'était le contraire qui avait lieu. En étudiant séparément les germes de chaque race, nous avons observé que les types V, VI, VIII et X présentent la plus grande quantité de germes attaquant la mannite et la salicine (50 p. 100) ; les races IV, XV, IX, XVII et VI restent le plus souvent inactives par rapport à la salicine et à la mannite (100 p. 100 à 70 p. 100) ; les germes fermentant la salicine et ne fermentant pas la mannite se rencontrent de

préférence parmi les pneumocoques des types XIV, XX, XXII et XXVIII ; le contraire se voit assez souvent dans les races VII et X.

En comparant les résultats de nos recherches actuelles avec ceux obtenus par Viktoroff, Zemtzova, Siniouchina, nous constatons un désaccord frappant : d'abord, la quantité de souches du groupe X ne fermentant pas l'inuline est beaucoup plus considérable parmi les germes isolés dans les pneumonies de l'enfance que parmi celles de l'adulte ; ensuite, la majorité des pneumocoques du groupe X (66 p. 100) étudiés dans ce travail n'attaquaient ni la salicine, ni la mannite, tandis que les germes isolés par les auteurs cités plus haut, fermentaient les deux sucres. Il est difficile d'expliquer cette discordance ; peut-être serait-il permis de supposer que, dans une certaine mesure, les propriétés biochimiques diffèrent suivant les races qui ont fait l'objet du travail précédent et actuel.

DEUXIÈME PARTIE

Quelques observations sur la variabilité des pneumocoques.

En étudiant la grande collection de pneumocoques que nous avons eus à notre disposition, nous avons constaté plusieurs faits ayant un grand intérêt au point de vue de la variabilité de ces germes.

La variabilité du pneumocoque, ses rapports avec le streptocoque vert et hémolytique, sa dissociation et le passage possible d'une race à l'autre, autant de questions qui, depuis longtemps, étaient l'objet d'études passionnées de plusieurs coque hémolytique se transformer en streptocoque vert et en auteurs.

Kruse et Pansini, en se basant sur des recherches nombreuses, ont émis l'hypothèse que le pneumocoque et le streptocoque appartiennent à un même genre et que les différents représentants de ce genre peuvent se transformer l'un dans l'autre. D'autres auteurs ont montré que le pneumocoque peut se transformer *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* en streptocoque vert et hémolytique. C'est ainsi que Rosenow a vu le strepto-

suite en pneumocoque. Celui-ci a passé finalement à l'état de streptocoque hémolytique. Cet auteur a obtenu ces transformations successives par culture en symbiose avec le *Bac. subtilis* en variant la concentration de sels la pression d'O₂ dans les milieux de culture. Neufeld, Morgenroth, Schiemann, Christensen ont vu un pneumocoque, conservé sous le vide dans les organes desséchés de souris injectée, se transformer en streptocoque hémolytique. Morgenroth et ses collaborateurs ont également observé la transformation du pneumocoque en streptocoque hémolytique. Ces auteurs ont fait agir sur le pneumocoque la levure tuée, le noir animal et l'optochine ; les mêmes résultats ont été obtenus après passage sur souris. Le germe a présenté des formes intermédiaires, les modifications A et B, avant de se transformer en forme C, laquelle était autre chose que le streptocoque hémolytique typique. Kaczynski et Wolff, Hintze, Berger et Jacob ont également rapporté des faits analogues.

Non moins intéressants sont les travaux concernant la dissociation du pneumocoque ; les rapports entre les formes dissociées et les polysaccharides spécifiques, la transformation possible d'un type en un autre ont été l'objet d'études de plusieurs auteurs.

Stryker obtenait la forme R du germe en le cultivant sur du bouillon additionné de 10 p. 100 de sérum spécifique homologe ; Griffith obtenait la forme R sur de la gélose au sang et sur la gélose de Levinthal (au sang chauffé). Reinman, en inoculant au cobaye et au chien des morceaux de gélose avec des formes S, isolait des formes R. Des résultats analogues ont été obtenus après implantation sous la peau du lapin, de tubes bouchés au collodion contenant des formes S. Wadsworth et Sickless ont trouvé des formes R typiques dans les valvulites bourgeonnantes du cœur de chevaux morts à la suite de l'immunisation avec des pneumocoques virulents. Dawson et Avery ont réussi à transformer la forme R en forme S en ensemençant la forme R dans un bouillon additionné de sérum anti-S. Griffith a inoculé sous la peau des souris des germes vivants du pneumocoque avirulent R mélangés à une culture du pneumocoque S, tuée par chauffage à 60°-80°. Il a isolé de ces souris des formes S très virulentes.

D'autres auteurs ont également observé *in vitro* et *in vivo* la transformation d'un type de pneumocoque en un autre. Ainsi, Silberstein, en étudiant la variabilité des pneumocoques, a vu un pneumocoque du groupe X se transformer en un pneumocoque du type I. Berger et Engelman, en faisant agir la levure tuée et l'optochine sur un pneumocoque du type III, l'ont transformé en un pneumocoque du type II. Wolff a vu un pneumocoque du type I se transformer dans l'organisme d'une souris immune en pneumocoque du type II. Griffith, en introduisant, sous la peau des souris, un mélange de culture vivante de forme R et d'un vaccin pneumococcique de type hétérologue, obtenait régulièrement le passage d'un type donné de pneumocoque en un autre. Dawson, en appliquant la même technique aux expériences *in vitro*, a obtenu des résultats analogues à ceux de Griffith.

Les recherches sur la variabilité et la dissociation des pneumocoques ont été effectuées soit *in vitro*, soit dans les expériences *in vivo* ; les observations sur la variabilité de ces germes dans l'organisme humain sont peu nombreuses. C'est ainsi que Berger et Engelmann ont isolé des crachats d'un pneumonique, un pneumocoque qui a donné deux variantes : un streptocoque vert et un streptocoque hémolytique ; ce dernier est repassé à l'état de pneumocoque. Paul a isolé des crachats une souche de forme R ; de même Amzel a trouvé quelquefois cette forme dans le pus pleural des pneumonies traitées par l'optochine. Viktoroff, Zemtsova et Ettinger ont montré que les pneumocoques de 3 premiers types isolés de pièces d'autopsie des adultes ayant succombé à la pneumonie franche, perdent parfois leur faculté de s'agglutiner. D'autre part, Viktoroff, Zemtsova et Mazel ont isolé du sang de pneumoniques, au moment ou un peu avant la crise, une variété voisine du streptocoque vert, un *Streptococcus viridans* vrai, en même temps que des pneumocoques typiques. Ces auteurs considèrent ces variétés atypiques comme résultant de la dissociation due à l'action des anticorps spécifiques circulant dans le sang. Enfin, Viktoroff, Dombrovskaja et Jeroféeff ont montré, par des recherches bactériologiques multiples effectuées sur les pneumonies des enfants, que les pneumocoques peuvent se

transformer dans l'organisme humain non seulement en streptocoque vert, mais aussi en streptocoque hémolytique.

Passons maintenant aux constatations que nous avons faites sur la variabilité des pneumocoques au cours de ce travail. Ces données nous ayant paru intéressantes, nous nous permettons de citer les protocoles les plus démonstratifs.

PREMIER CAS. — *Il s'agit d'un pneumocoque ayant perdu ses propriétés agglutinantes, après conservation prolongée à la glacière, sur sérum semi-liquide.*

25 au 29 janvier 1934. Une souris infectée avec des crachats du malade J... (protocole N° 6). On isole du sang de l'animal un pneumocoque de type XXVII, de virulence moyenne (DLM = 10—⁴ cent. cube de culture). La première culture, aussi bien que les cultures-filles obtenues par ensemencement d'une seule colonie, agglutinant avec le sérum XXVII. La souche est repiquée sur sérum semi-liquide et conservée à la glacière.

26 au 28 janvier 1935. — Identification du type et détermination de la virulence de la culture conservée, après repiquage mensuel sur milieu semi-liquide neuf. La virulence n'a pas changé, mais le pneumocoque n'est plus agglutiné par aucun des 31 sérums spécifiques.

DEUXIÈME CAS. — *Transformation d'un pneumocoque de type III en variété VIII. Conservation sur sérum semi-liquide à la glacière.*

19 au 23 avril 1935. Infection de la souris avec les crachats du malade B... (protocole N° 133). Un pneumocoque très virulent, type III (DLM = 10—⁸ cent. cube de culture) est isolé du sang du cœur. Il présentait sur la gélose au sang des colonies muqueuses typiques. Conservation au sérum semi-liquide.

14 au 17 mai 1935. La culture ne donne plus les colonies muqueuses caractéristiques, n'est plus agglutinée par le sérum type III, mais agglutine bien avec le sérum du type VIII ; sa virulence est tombée à DLM = 10—⁴ cent. cube de culture.

TROISIÈME CAS. — *Transformation du pneumocoque type XIX en type VIII ; conservation dans les organes desséchés de la souris dans le vide.*

20 au 22 novembre 1934. Souris inoculée avec les crachats du malade B... (protocole n° 64). Isolement d'un pneumocoque très virulent (DLM = 10—⁷ cent. cube de culture) de type XIX. La souche est conservée sur sérum semi-liquide ; les organes desséchés de la souris sont gardés dans une cloche à vide.

9 au 11 janvier 1935. La souche conservée sur sérum semi-liquide garde son type sérologique et sa haute virulence.

2 au 9 novembre 1935. Une souris est infectée avec le cœur desséché de l'animal ayant succombé le 21 novembre 1934. Mort le cinquième jour. Isolement d'un pneumocoque peu virulent (DLM = 10—² cent. cube de culture) de type VIII.

QUATRIÈME CAS. — *Transformation d'un pneumocoque non agglutinable en pneumocoque de type VI et XV. Conservation sur sérum semi-liquide à la glacière et dans les organes desséchés dans le vide.*

22 au 30 novembre 1934. Une souris est infectée avec un petit morceau de poumon du malade B... (protocole n° 64, voir cas 3). L'animal succombe le quatrième jour ; on isole du sang un pneumocoque peu virulent (DLM = 10^{-1} cent. cube de culture) qui n'est agglutiné par aucun des sérums qui étaient à notre disposition.

Conservation à la glacière sur sérum-liquide. Les organes sont desséchés et conservés dans le vide.

9 au 15 janvier 1935. Passage sur souris de la souche conservée sur sérum semi-liquide. L'animal succombe le troisième jour. De nouveau, on isole un pneumocoque de faible virulence (DLM = 10^{-1} cent. cube de culture) qui n'agglutine pas.

17 au 22 février 1935. Une souris est infectée avec le cœur desséché de l'animal mort le 25 janvier 1935. Elle succombe vingt-quatre heures après. On isole un pneumocoque très virulent (DLM = 10^{-8} cent. cube de culture) de type VI. Le germe est conservé comme d'habitude (sérum semi-liquide, organes desséchés).

9 au 13 mai 1935. Analyse sérologique de la souche isolée le 12 janvier 1935 et conservée sur sérum semi-liquide : ce pneumocoque n'est toujours pas agglutiné par aucun de nos sérums ; il reste peu virulent (DLM = 10^{-1} cent. cube de culture).

Par contre, la virulence de la culture du 18 février 1935 reste très haute (DLM = 10^{-8} cent. cube de culture) ; le germe est, comme dans l'épreuve précédente, agglutiné par le sérum anti-VI.

16 au 22 mars 1936. On procède de nouveau à l'identification de la souche du 18 février 1935, repiquée chaque mois sur sérum et conservée à la glacière. La culture n'agglutine plus par le sérum anti-VI, mais donne une agglutination nette avec le sérum anti-XV ; sa virulence est faible (DLM = 10^{-2} cent. cube de culture).

Dans ce cas, on le voit, nous avons rencontré un pneumocoque non agglutinable, peu virulent ; conservé dans des organes desséchés de la souris, il s'est transformé en pneumocoque très virulent du type VI ; le même germe conservé sur milieu semi-liquide s'est transformé en un pneumocoque peu virulent du type XV. Il faut encore noter que dans les cas 3 et 4 il s'agissait des pneumocoques isolés de produits différents (crachats et poumons) d'un même malade, ce qui montre la grande variabilité du germe.

CINQUIÈME CAS. — *Transformation d'un pneumocoque de type VII en pneumocoque III, après passage sur souris.*

22 au 27 novembre 1934. Les crachats du malade A... (protocole n° 67) sont inoculés à une souris. Isolement d'un pneumocoque VII très virulent (DLM = 10^{-7} cent. cube de culture). Conservation de la souche sur milieu semi-liquide dans la glacière.

19 au 28 février 1935. Identification du type et détermination de la virulence de la culture, mise à la conservation le 23 février 1934 et repiquage chaque mois sur sérum semi-liquide. La culture continue

à être agglutinée par le sérum anti-VII et garde sa haute virulence. On inocule une souris avec cette culture. Le pneumocoque isolé tue la souris à la dose de 10—8 cent. cubes de culture, et donne sur la gélose au sang des colonies muqueuses non agglutinées par le sérum anti-VII, mais présentant une agglutination des plus nettes avec le sérum anti-III. La souche isolée estensemencée sur sérum semi-liquide et conservée à la glacière.

25 au 28 mai 1935. Identification du type et détermination de la virulence de la souche, mise en conservation le 27 mai 1935. Le pneumocoque, repiqué chaque mois, garde sa haute virulence et continue à être agglutiné par le sérum anti-III.

SIXIÈME CAS. — *Transformation en streptocoque hémolytique d'un pneumocoque de type IV, conservé longtemps dans les organes desséchés de souris dans le vide.*

13 au 16 avril 1934. Les crachats du malade B... (protocole n° 35) ont été inoculés à une souris. Isolement d'un pneumocoque de type IV. Les organes de la souris ont été desséchés et conservés dans le vide.

3 au 6 février 1935. Une souris est infectée avec le cœur de l'animal mort le 15 avril 1934. On a isolé du sang une culture pure d'un streptocoque hémolytique. La culture en bouillon tombe au fond du tube et présente, sur les frottis, de longues chaînettes.

SEPTIÈME CAS. — *Transformation d'un pneumocoque de type XVIII en streptocoque hémolytique par passage sur souris.*

21 au 26 janvier 1934. Souris infectée avec les crachats du malade B... (protocole n° 4). Isolement d'un pneumocoque virulent (DLM = 10—⁶ cent. cube de culture) de type XVIII. La culture est gardée à la glacière.

4 au 7 mai 1936. Des passages périodiques sur souris avec repiquages consécutifs sur milieu semi-liquide ont été effectués tous les mois pendant deux ans et quatre mois. La souche agglutine très bien avec le sérum anti-XVIII. Deux souris sont inoculées avec des doses 10—⁵ cent. cube et 10—⁶ cent. cube de culture. L'ensemencement du sang de 2 souris a donné une culture pure de streptocoque hémolytique, tombant au fond du tube et présentant de longues chaînettes sur les frottis.

Les résultats que nous venons de relater et qui confirment les données des autres auteurs, permettent de conclure à la grande variabilité du pneumocoque. Ce germe peut présenter *in vitro*, aussi bien qu'*in vivo*, des variations consistant dans la perte de ses propriétés agglutinantes, dans la transformation d'un type en un autre, dans l'augmentation et la diminution de la virulence et dans la transformation du pneumocoque hémolytique.

Résumé.

1° Les recherches sur les propriétés biologiques des pneumocoques du groupe X, isolés dans les pneumonies de l'enfance, ont donné les résultats suivants :

A. ÉTUDE DE LA VIRULENCE. — *a)* Parmi les 152 souches de pneumocoques de races différentes, 47 p. 100 étaient peu virulentes ($\text{DLM} = 10^{-1}$ à 10^{-3} cent. cubes de culture), 15 p. 100 entraient dans la catégorie des souches virulentes ($\text{DLM} = 10^{-3}$ à 10^{-6} cent. cubes de culture) et 38 p. 100 étaient de virulence très grande ($\text{DLM} = 10^{-7}$ à 10^{-8} cent. cubes de culture).

b) La répartition des souches de différente virulence parmi les différentes races est sujette à variations : toutefois, les types XIV, XVII, XIX, VII et XV sont le plus souvent de faible virulence ; les pneumocoques des types V, XX, VIII, XVIII et XXV sont les plus virulents ; les autres types présentent des germes de virulence différente.

c) Le degré de virulence propre à chaque type de pneumocoque semble être constant et relativement stable : les souches, très virulentes, gardent leur virulence des mois et des années lorsqu'elles sont conservées dans des conditions convenables et périodiquement passées sur souris ; il est très difficile d'augmenter la virulence des souches peu virulentes.

B. ÉTUDE DU POUVOIR HÉMOLYTIQUE. — *a)* Nous avons étudié les propriétés hémolytiques de 42 souches de races et virulences différentes.

b) Les souches hémolytiques se rencontrent le plus souvent dans les races V, VI, XX et XIII.

c) Le pouvoir hémolytique des pneumocoques paraît être lié à sa virulence, mais il ne l'accompagne pas nécessairement.

C. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — *a)* 115 souches ont été étudiées au point de vue de leur action sur l'inuline, la salicine et la mannite.

b) 23 p. 100 des souches étudiées n'attaquent pas l'inuline, 66 p. 100 ne fermentent ni la salicine ni la mannite, 15 p. 100 des souches fermentent l'une et l'autre, 13 p. 100 fermentent la salicine et n'attaquent pas la mannite et pour 6 p. 100 des souches, c'est le contraire qui a lieu.

c) La fréquence avec laquelle on rencontre des souches fermentant ou non les sucres peut varier dans chaque race.

2° Nos recherches prolongées sur les pneumocoques mis en conservation dans différentes conditions et soumis à des passages périodiques sur souris ont permis de constater certains faits parlant en faveur de la variabilité considérable de ces germes : telles sont la transformation d'un type en un autre, l'augmentation ou la diminution de la virulence et la transformation des pneumocoques en streptocoques hémolytiques.

BIBLIOGRAPHIE

- VIKTOROFF (L. K.), ZEMTZOVA (O. M.) et SINIUCHINA, *Zntrbl. f. Bakt., I. Orig.*, **130**, 1933, p. 24.
- VIKTOROFF (L. K.), ZEMTZOVA (O. M.) et MAZEL (I. I.), *Zntrbl. f. Bakt., I. Orig.*, **130**, 1933, p. 35.
- VIKTOROFF (L. K.), ZEMTZOVA (O. M.) et ETTINGER (I. G.), *Zntrbl. f. Bakt., I. Orig.*, **129**, 1933, p. 324.
- VIKTOROFF (L. K.), DOMBROVSKAIA (I. I.) et IEROFEEFF (L. A.), *Zntrbl. f. Bakt., I. Orig.*, **132**, 1934, p. 413.
- COOPER, EDWARDS et ROSENSTEIN., *J. exp. Med.*, **49**, 1929, p. 461.
- COOPER, ROSENSTEIN, WALTER et PEIZER, *J. exp. Med.*, **55**, 1932, p. 531.
- GUNDEL, *Ztschr. f. Hyg.*, **115**, 1933, p. 495.
- ROSENOW, *Zbl. f. Bakter., Orig.*, **73**, 1914, p. 284. — *J. of Infect. Dis.*, **14**, 1914, p. 1.
- MORGENROTH, SCHNITZER et BERGER, *Ztschr. f. Immfrsch.*, **43**, 1925, p. 169.
- SCHIEMANN, *Ztschr. f. Immfrsch.*, **24**, 1914, p. 1.
- KUCZYNSKI et WOLFF, *B. kl. W.*, n° 29, p. 1921.
- STRYKER, *J. exp. Med.*, **24**, 1916, p. 49.
- BERGER et JAKUB, *Ztschr. f. Immfrsch.*, **43**, 1925, p. 235.
- REIMANN, *J. exp. Med.*, **41**, 1925, p. 587 ; **42**, 1928, p. 107 ; **45**, 1927 p. 1.
- WADSWORTH et SICKLES, *J. exp. Med.*, **45**, 1927, p. 787.
- DAWSON et AVERY, *Proc. Soc. exp. biol. a. med.*, **24**, 1927, p. 943.
- GRIFFITH, *J. of Hyg.*, **27**, 1928, p. 112.
- NEUFELD et LEVINthal, *Ztschr. f. Immfrsch.*, **53**, 1928, p. 324.
- SILBERSTEIN, *Ztschr. f. Hyg.*, **107**, 1927, p. 725.
- BERGER et ENGELMANN, *D. m. W.*, n° 32, 1925.
- DAWSON, *J. exp. Med.*, **51**, 99, 1930, p. 123 ; **54**, 1931, p. 681.
- ANIZEL, *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 1927, p. 1487

**MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES, CAUSÉES
CHEZ LE COBAYE SAIN
ET CHEZ LE COBAYE TUBERCULEUX
PAR DES INJECTIONS D'EXTRAIT ACÉTONIQUE
DE BACILLES DE KOCH**

par L.-P.-H.-J. DE VINK et J.-H. TEN THIJE.

On sait que A. Boquet et L. Nègre ont montré, dès 1924, que les substances ciro-graisseuses, extraites du bacille de Koch par l'acétone, ont un pouvoir activant sur la tuberculose des animaux d'expérience auxquels on les injecte. D'après L. Nègre et J. Valtis, les injections d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux seraient capables d'augmenter à tel point la virulence des filtrats tuberculeux dans l'organisme des cobayes inoculés avec ces filtrats, qu'on peut se dispenser d'effectuer des passages de cobaye à cobaye pour la mise en évidence des éléments filtrables du bacille tuberculeux.

En étudiant la littérature sur ce sujet, nous avons été frappés par le peu d'attention, vouée par les différents auteurs aux lésions anatomo-pathologiques, dues aux injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch. Il nous a paru indispensable, pour une meilleure compréhension du problème, de rechercher la nature éventuelle de ces lésions. Notre tâche a été grandement facilitée par la bienveillance de notre collègue F. van Deinse, de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu mettre à notre disposition les quantités d'extrait acétonique nécessaires à ces recherches, et que nous tenons à remercier ici.

Dans l'extrait acétonique, se trouvent, d'un côté, les substances ciro-graisseuses du bacille tuberculeux ; d'autre part, des débris de bacilles morts. Notre premier but a été de rechercher l'action de l'extrait total. Des expériences ultérieures devront mettre en évidence une action éventuelle des débris bacillaires seuls. Il sera également nécessaire de faire l'analyse biochimique pré-

cise des substances extraites par l'acétone. Nous citerons seulement ici les recherches de Sabin, Doan et Forkner, qui ont observé la formation de cellules épithélioïdes et de cellules géantes du type Langhans sous l'influence des fractions lipéoïdiques (phosphatides) du bacille tuberculeux.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES.

6 cobayes normaux reçurent pendant quatre mois des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique total par voie sous-cutanée à l'aîne gauche (1 cent. cube par injection). Ces quatre mois de traitement terminés, les 6 cobayes furent sacrifiés, et leurs organes inoculés à 10 cobayes neufs, soumis à leur tour au traitement par l'extrait acétonique pendant huit à douze semaines.

Les intradermo-réactions à la tuberculine diluée et au filtrat chauffé de cultures jeunes de bacilles de Koch, répétées plusieurs fois, sont toujours restées négatives. Dans les frottis des ganglions sous-lombaires de 3 de ces cobayes, nous trouvâmes des débris acido-résistants provenant de l'extrait acétonique, sous forme de granules et de bacilles courts. On trouve presque toujours de l'infiltration au point des injections d'extrait ; quelquefois, cette infiltration est en voie de résorption ; dans ce cas, il y a de la prolifération tantôt diffuse, tantôt circonscrite de tissu conjonctif. Le ganglion inguinal satellite était toujours tuméfié, jusqu'à atteindre les dimensions d'un haricot.

Le ganglion sous-lombaire, du côté où ont été effectuées les injections d'extrait acétonique, est toujours tuméfié. Ces ganglions tuméfiés ont une consistance élastique, ils ne sont ni durcis ni caséeux. La rate n'est jamais hypertrophiée ; mais le dessin des follicules est bien accentué. Aucune lésion du foie visible à l'œil nu. Par contre, les poumons présentent régulièrement de petits foyers sous-miliaires bien limités, d'aspect mat. Aucun de ces foyers n'est caséeux. Les ganglions trachéo-bronchiques ont des dimensions variables, allant de celles d'une tête d'allumette jusqu'à celle d'un grain d'avoine. L'examen microscopique de ces organes nous a permis de déceler des modifications histologiques qu'on ne trouve pas chez des cobayes normaux non traités, vivant dans

les mêmes conditions. On trouve très souvent, chez le cobaye normal, une infiltration périvasculaire à petites cellules dans les poumons, et, à certains endroits, de tout petits foyers composés de polyblastes et de lymphocytes dans les cloisons interalvéolaires. Or, chez les cobayes traités par l'extrait acétonique, il y a un grossissement frappant des cloisons interalvéolaires. A côté des cellules qu'on y trouve normalement, on voit des polyblastes, des lymphocytes, ainsi que des cellules ayant un protoplasme coloré de rouge et un grand noyau, pauvre en chromatine, et d'aspect gonflé. Ce noyau est tantôt rond ou ovale, tantôt comme étiré en longueur, et ressemble à celui d'une cellule épithélioïde. Dans plusieurs coupes des poumons on trouve des plages d'infiltration de forme irrégulière (fig. 4), dans lesquelles on peut encore distinguer quelquefois la structure alvéolaire, et qui contiennent, à côté des cellules normales, des histiocytes, des lymphocytes, des polynucléaires, mais surtout des cellules déjà mentionnées, à noyau pauvre en chromatine. Chez certains animaux, ces plages contiennent des cellules géantes à dix noyaux ou au-dessus (fig. 1 et 2). Ces cellules se distinguent des cellules géantes du type Langhans parce que leurs noyaux ne sont pas situés à la périphérie, et qu'ils sont plus volumineux et moins riches en chromatine que les noyaux des cellules de Langhans. L'examen histologique du foie ne révèle aucune modification chez la plupart des animaux. Seuls, les noyaux des cellules de Kupffer se montrent un peu plus accentués de temps en temps, sans qu'on puisse parler d'une réaction nette du système réticulo-endothélial. Chez un seul animal, nous avons trouvé des foyers miliaires dans le foie, contenant des cellules hépatiques en état de dégénérescence, et même de nécrobiose, avec caryorrhexie à peu près totale, alors que les restes de protoplasme prenaient une couleur plus foncée et confluaient. A la périphérie de ces foyers, nous trouvâmes une prolifération de cellules étoilées de Kupffer, qui présentaient beaucoup de formes intermédiaires, et ressemblaient quelquefois aux cellules sus-mentionnées à noyau pauvre en chromatine. Nous n'avons vu cette prolifération qu'aux environs immédiats des foyers en question.

INJECTIONS D'EXTRAIT ACÉTONIQUE DE BACILLES DE KOCH

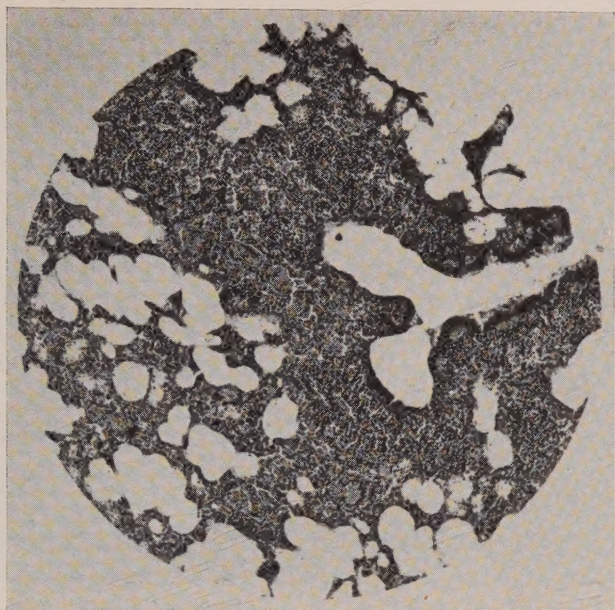


FIG. 1. — Photographie à faible grossissement (63 fois) d'une des plages infiltratives qu'on trouve dans les poumons des cobayes neufs, traités par l'extrait acétonique.

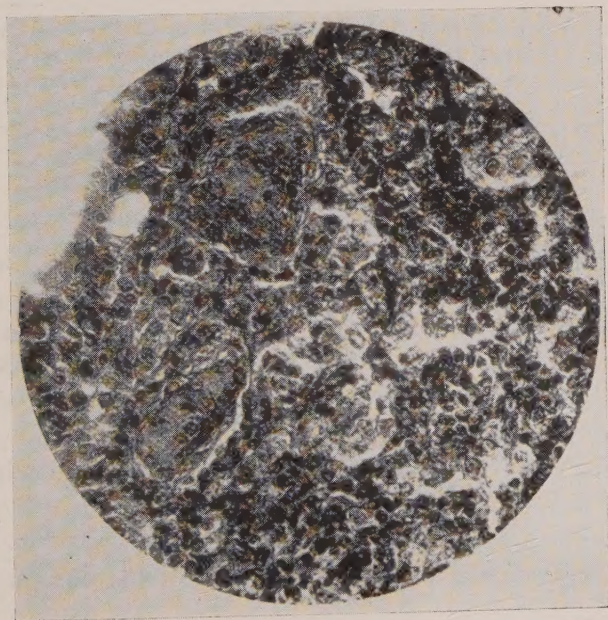


FIG. 2. — Photographie à plus fort grossissement d'une partie de la plage représentée par la figure 1 (400 fois). On voit très bien les cellules géantes.

Quant aux modifications histologiques de la rate, elles consistent chez beaucoup d'animaux en la présence d'une bande albumineuse d'une largeur constante et d'une couleur uniforme, autour des follicules, dont les dimensions sont variables (fig. 3). Dans ces bandes, on voit différents noyaux, dont certains sont pauvres en chromatine, d'autres allongés et pycnotiques; jamais on n'y trouve des lymphocytes nettement caractérisés (fig. 4). Une seule fois, les colorations appropriées permirent de constater la présence d'amyloïde dans ces bandes. La pulpe de la rate contient à peu près constamment de très nombreuses cellules à noyau volumineux, ovale, pauvre en chromatine.

Nous avons déjà dit plus haut que les frottis des ganglions sous-lombaires peuvent contenir des éléments acido-résistants. Nous n'avons jamais réussi à trouver de ces éléments dans les coupes des différents organes, colorées au Ziehl. Nous avons pu mettre en évidence de petits granules de pigment dans la rate, mais ceux-ci n'étaient pas acido-résistants.

Voyons maintenant quelles sont les lésions anatomo-pathologiques provoquées chez le cobaye tuberculeux par les injections d'extrait acétonique.

10 cobayes neufs furent tuberculisés par l'inoculation de 0 milligr. 01 de bacilles tuberculeux du type humain à l'aîne gauche. 5 parmi eux reçurent pendant sept semaines des injections bi-hebdomadaires sous-cutanées de 1 cent. cube d'extrait acétonique de bacilles de Koch à l'aîne gauche. Tous les animaux furent sacrifiés sept semaines après l'inoculation virulente.

à centre caséeux et d'aspect mat, dont les dimensions varient

Tous ces animaux ont été régulièrement éprouvés à la tuberculine. Les premières intradermo-réactions positives se produisirent chez 3 cobayes traités et chez 1 cobaye non traité. Les intradermo-réactions, régulièrement répétées, étaient en général plus fortement positives chez les animaux traités que chez les non traités. A l'autopsie, tous les cobayes ont des ganglions inguinaux tuméfiés du côté gauche; mais chez ceux qui ont subi le traitement par l'extrait acétonique, il y a une forte infiltration périglandulaire, qui fait défaut chez les non traités. La rate des animaux traités contient plusieurs foyers

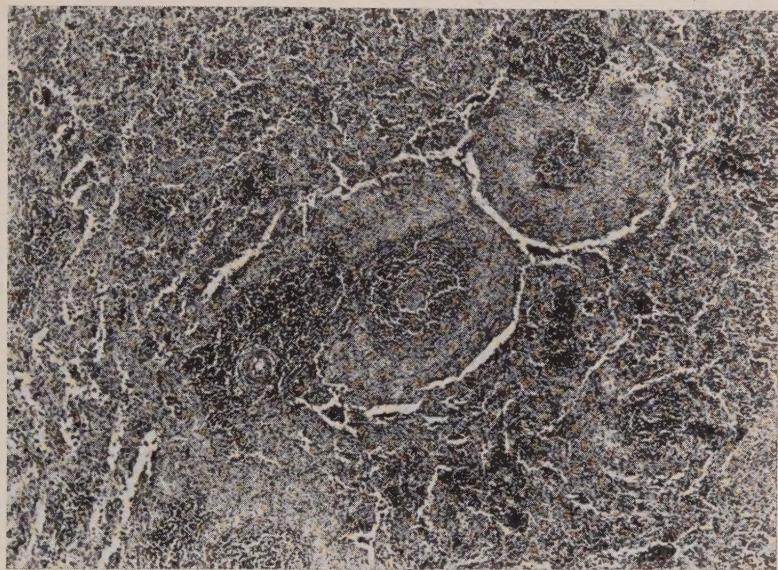


FIG. 3. — Rate d'un cobaye, traité pendant quatre mois par des injections d'extrait acétonique de bacille de Koch. On voit les bandes typiques autour des follicules (grossissement 65 fois).

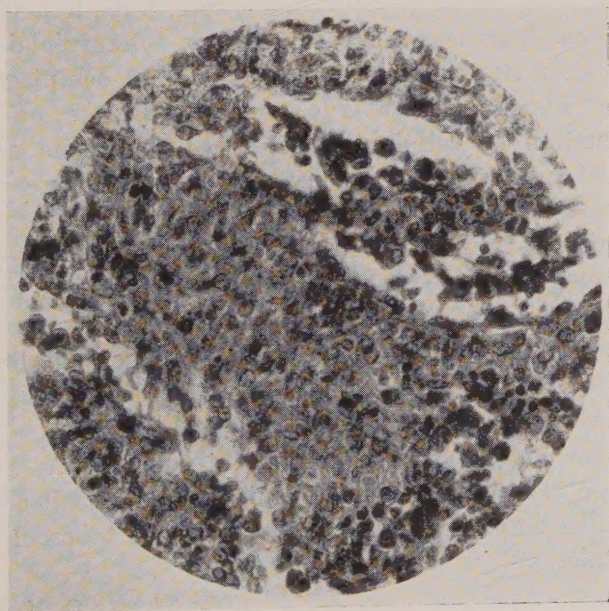


FIG. 4. — Pulpe de la même rate (grossissement 400 fois). On voit des cellules à noyau pauvre en chromatine.

de celles d'une tête d'épingle à celles d'un pois. Le foie contient des tubercules sous-miliaires chez 3 animaux traités. Les lésions tuberculeuses des ganglions lombaires et rétropéritonéaux sont beaucoup plus avancées chez les cobayes traités que chez les non traités. Les poumons des animaux traités présentent des foyers sous-miliaires, d'aspect mat, qui n'ont pas, à l'examen microscopique, la constitution de tubercules. Nous croyons devoir attribuer ces modifications à l'action des injections d'extrait acétonique. L'examen histologique de la rate révèle chez les animaux traités l'existence d'une tuberculose diffuse, alors que chez les non traités il n'y a que quelques rares tubercules isolés.

Il résulte de nos expériences :

1° Que l'extrait acétonique de bacilles de Koch, tel qu'il est préparé à l'Institut Pasteur, ne contient pas de bacilles tuberculeux vivants ;

2° Que les injections de cet extrait provoquent chez le cobaye neuf une réaction tissulaire dans différents organes. Le système réticulo-endothélial de la rate réagit de façon toute particulière. A quelques exceptions près, aucune réaction microscopique ne se produit dans le foie. Dans le poumon, on trouve un épaissement des cloisons intervalvéolaires avec prolifération des cellules du mésenchyme et des plages prolifératives disséminées. Dans le poumon et la rate, on constate la formation de cellules spéciales à protoplasme coloré de rouge et à noyau volumineux, en ballon, pauvre en chromatine, de forme ronde, ovale ou allongée. Plusieurs fois, on a trouvé des cellules géantes d'un type différent de celui de Langhans, dont les noyaux ne se trouvaient pas à la périphérie, mais répartis de manière diffuse à travers le protoplasme, qui, lui, est souvent coloré de rouge dans les parties qui entourent les noyaux. Le nombre de ces noyaux dépasse généralement 10 par cellule ;

3° Que nos expériences confirment celles de A. Boquet et L. Nègre, d'après lesquelles les injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch activent les processus de tuberculose expérimentale.

Le Gérant : G. MASSON.